VERSUCHE ZUR FERMENTATIVEN OXYDATION UND HYDROXYLIERUNG DES ISONICOTINSÄUREHYDRAZIDS

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus-Dieter Hengstmann
aus Berlin

1968

VERSUCHE ZUR FERMENTATIVEN OXYDATION UND HYDROXYLIERUNG DES ISONICOTINSÄUREHYDRAZIDS

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus-Dieter Hengstmann
aus Berlin

1. Referent: Prof. Dr. H. Loth

2. Referent: Prof. Dr. G. Schenck

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Letzter Tag der mündlichen Prüfung: 2.7.1968

Tag der Promotion: 15. JULI 1968

Meiner Frau und meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552705_0040

Diese Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Helmut Loth durchgeführt.

Herrn Prof. Loth möchte ich für das Thema dieser Arbeit, für seine stetige Bereitschaft, über die Probleme dieser Dissertation zu diskutieren, und für seine wertvollen Ratschläge und wissenschaftliche Förderung meinen herzlichen Dank aussprechen.

An dieser Stelle möchte ich mich für seine menschliche Anteilnahme meinen persönlichen Belangen gegenüber aufrichtig bedanken.

Dank schulde ich auch den Direktoren des pharmazeutischen Instituts, meinem akademischen Lehrer Herrn Prof. Dr. Gerhard Schenck und Herrn Prof. Dr. Fritz Eiden.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
II. ALLGEMEINER TEIL	7
A. Analytisch-dünnschichtchromatographische Trennung und Identifizierung der Substanzen	7
B. Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Oxydation des INH durch Peroxydase	9
1.) Abhängigkeit vom pH-Wert	9
2.) Abhängigkeit von der H_2O_2-Konzentration	10
3.) Abhängigkeit von der Peroxydase-Konzentration	10
4.) Kontinuierliche Peroxydase und Peroxydase-H_2O_2-Zugabe zu dem Ansatz während der Reaktion	11
5.) Halbquantitative Untersuchungen über die Zusammensetzung des Oxydationsansatzes	12
C. Spektralphotometrische Untersuchungen im UV-Bereich	14
1.) UV-Spektren der Substanzen	14
2.) Spektren der Reaktionslösungen nach der Oxydation	14
3.) Untersuchungen über die Inhibition der Peroxydase durch INH und seine Oxydationsprodukte	18
4.) Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k_4^* für die Inhibitionsuntersuchung von INH an POD	20
D. Isolierung und Strukturaufklärung der Substanz Sx	24
1.) Isolierung der Substanz Sx	24
2.) Identität- und Reinheitsprüfung der Substanz Sx	24
3.) Untersuchungen über die Bildung von INA aus INS und Ammoniak	26
4.) Anwendung der Peroxydase-H_2O_2-Reaktion auf die einzelnen Oxydationsprodukte	26
E. Suche nach einer quantitativen Trennungs- und Bestimmungsmethode	28
1.) Säulenchromatographie	28
2.) Kombination von DC mit UV-Messung	28
3.) Fällung der Substanzen mit Hilfe von Metallionen	29
4.) Titrationsmethoden	29
5.) Gaschromatographie	30
F. Infrarot-Spektren der Substanzen	31
1.) Spektrum von INS	31
2.) Spektrum von INA	32
3.) Spektrum von INH	33
4.) Spektrum von DINH	33
5.) Spektrum von IIHON	34

Seite

G. Oxydation von INH mit Hämin 36
1.) Oxydation von INH mit Hämin und H_2O_2 36

H. Oxydationsansätze unter Zusatz von Dihydroxyfumarsäure 38
1.) Eigenschaften von Dihydroxyfumarsäure 38
2.) Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Umsetzungen von INH im POD-DHF-H_2O_2-System 39
a.) Abhängigkeit vom pH-Wert
b.) Abhängigkeit von der H_2O_2-Konzentration
c.) Abhängigkeit von der POD-Konzentration
d.) Abhängigkeit von der DHF-Zugabe
3.) Isolierung der Substanz Sy 41
4.) Untersuchungen auf die chemischen Gruppen im Molekül 41
5.) Molekulargewichtsbestimmung und Aufstellung der Summenformel 43
6.) Oxydimetrische Titration mit Kaliumdichromat 44
7.) Acidimetrische Titration 45
8.) Oxydation von INA, DINH, IIHON mit DHF-H_2O_2 46
9.) Spektren der Substanzen Sy und acetylierte Sy 46
a.) UV-Spektren
b.) IR-Spektren von Sy und von acetyliertem Sy
c.) NMR-Spektrum von acetylierter Sy
10.) Zusammenfassung der ermittelten Strukturelemente 50
11.) Strukturaufklärung der Substanz Sy durch Synthese 51

I. Oxydation von INH mit POD in Gegenwart von NADH und NADPH 54
1.) Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Umsetzung von INH mit POD-NADH-H_2O_2 54
2.) Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Umsetzung von INH mit POD-NADPH-H_2O_2 56

III. DISKUSSION 58

IV. PRAKTISCHER TEIL 63

J. Darstellung der Substanzen 63
1.) N-N'-Diisonicotinoylhydrazin 63
2.) N-Isonicotinoyl-N'-Isonicotinalhydrazon 64
3.) Isonicotinsäureamid 65
4.) Glyoxal-diisonicotinoylhydrazon 66
5.) Acetylierung von Glyoxal-diisonicotinoylhydrazon bzw. Sy 66
6.) Sonstige Substanzen 67

Seite

K. Isolierung der Substanzen Sx und Sy 67

1.) Isolierung der Substanz Sx (INA) 67
2.) Isolierung der Substanz Sy (Glyoxal-diiso-nicotinoylhydrazon 68

L. Peroxydase-Aktivitätsbestimmung 69

1.) Aktivitätsbestimmung der Peroxydase 69
2.) Berechnung der Fermentkonzentration 70

M. Herstellung der Pufferlösungen 71

1.) Herstellung der Stammlösungen 71
2.) Herstellung der Pufferlösungen 71

N. Herstellung der Meßlösungen für die UV-Spektroskopie 71

O. Dünnschicht- und Säulenchromatographie 72

1.) Dünnschichtchromatographie 72
2.) Säulenchromatographie 73

P. Fällung der Substanzen mit Hilfe von Metallionen 73

Q. Reinigung und Bestimmung des Hämins 73

1.) Reinigung von Hämin nach Fischer 73
2.) Bestimmung des Hämins als Pyridin-hämochromogen-Komplex 74

R. UV-Spektrum von NADH bzw. NADPH und Reduktion von NADP zu NADPH 75

1.) UV-Spektrum von NADH bzw. NADPH 75
2.) Enzymatische Reduktion von NADP zu NADPH mit Glukose-6-phosphat und Glukose-6-phosphat-dehydrogenase 76

S. Enzyme und Kofaktoren 77

V. MESSTECHNISCHER TEIL 78

VI. ZUSAMMENFASSUNG 79

VII. LITERATURVERZEICHNIS 81

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Isonicotinsäurehydrazid (INH) wurde das erste Mal 1912 von Meyer und Mally (1) synthetisiert und von Grunberg und Schnitzer 1952 (2) gleichzeitig mit Offe, Siefken und Domagk (3) in die Therapie eingeführt.

Seit dieser Zeit wurden viele wissenschaftliche Untersuchungen mit INH durchgeführt, die zu einem großen Teil in den Arbeiten von Krüger-Thiemer: Chemie des Isoniazids (4) und Biochemie des Isoniazids (5) zusammengefaßt worden sind.

Angeregt durch die Arbeiten von Krüger-Thiemer (6,7,8), die eine Oxydation von INH durch Peroxydase (POD) beschreiben, und durch die Arbeit von Albert und Rees (9), die eine Zerstörung von INH in Gegenwart von Hämin beschreibt, wurde versucht, weitere Oxydationsprodukte aus der Reaktion von INH mit Peroxydase und Wasserstoffperoxid zu finden.

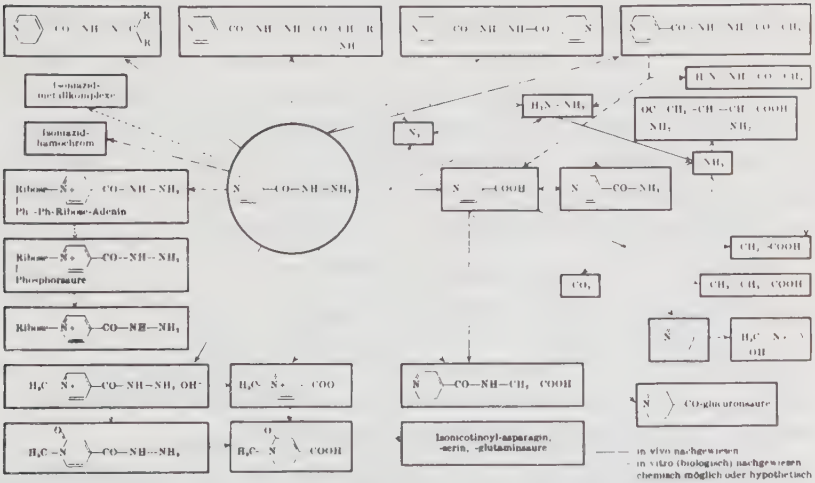


Abb.1 Biochemische Umwandlungsmöglichkeiten des INH nach Krüger-Thiemer (10)

In Mycobacterium tuberculosis wurde von Kaeppler (11) Peroxydase nachgewiesen. Das Ferment Peroxydase wurde nicht nur bei den höheren Pflanzen, sondern auch bei den Pilzen, wie auch in den Bakterien und Tieren gefunden (12).

Peroxydase ist in bezug auf die von ihm oxydierte Substanz nicht streng spezifisch. Ihre Anwendung bezieht sich auf viele Gebiete, wie z.B.:

Monoamine, Diamine, Phenole, Diphenole, aromatische Säuren, Leukofarbstoffe, komplizierte organische Verbindungen biologischen Ursprungs (Flavone, Ascorbinsäure u.a.m.) und andere Verbindungen wie Jodide und Nitrite.

Die Untersuchungen von Krüger-Thiemer zeigen, daß eine Oxydation von Säurehydraziden mit Hilfe von Peroxydase möglich ist.

Nach Chance wird für die Reaktion zwischen Peroxydase, Wasserstoffperoxid und einem Wasserstoffdonator folgender Mechanismus formuliert (13):

Ein Mol Peroxydase ergibt mit einem Mol H_2O_2 eine grüne Verbindung I, diese enthält noch die gesamte Oxydationskapazität des Peroxids. Diese Verbindung I ist unbeständig, und unter Dehydrierung des Wasserstoffdonators nimmt dieser Komplex I ein Elektron auf, und geht in die hellrote Verbindung II über. Unter nochmaliger Dehydrierung eines Donatormoleküls nimmt der Komplex II ein weiteres Elektron auf, wobei sich H_2O und POD bildet. In Gegenwart von H_2O_2-Überschuß entsteht aus Verbindung II eine dunkelrote Verbindung III. Zusammenfassend kann man die Reaktion wie folgt aufstellen:

$$\text{POD}\cdot Fe^{3+} + H_2O_2 \longrightarrow \text{Komplex I}$$

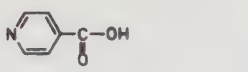
$$\text{Komplex I} + AH_2 \longrightarrow \text{Komplex II} + AH^{\cdot}$$

$$\text{Komplex II} + AH_2 \longrightarrow \text{POD}\cdot Fe^{3+} + AH^{\cdot}$$

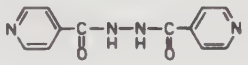
wobei H_2A den Wasserstoffdonator, H_2O_2 den Wasserstoffakzeptor und A den oxydierten Donator darstellt.

In einer Zusammenfassung von Krüger-Thiemer über die Biochemie des Isoniazids hat der Autor im Kapitel Metaboliten die Umwandlungsmöglichkeiten des INH in der Abb.1 zusammengestellt.

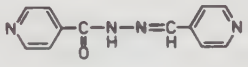
Von diesen biochemischen Umwandlungsmöglichkeiten des INH gelang es Krüger-Thiemer, aus seinen Ansätzen von INH mit POD und H_2O_2 (14), folgende Oxydationsprodukte zu isolieren und zu identifizieren:



Isonicotinsäure (INS)



Diisonicotinoylhydrazin (DINH)

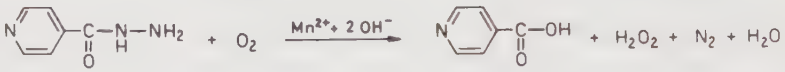


N-Isonicotinoyl-N'-isonicotinal-hydrazon (IINON)

Da für die Wirkung eines Chemotherapeuticum die Kenntnisse über seine Umwandlungsprodukte von großer Bedeutung sind wurde die Möglichkeit des Vorhandenseins weiterer Umwandlungsprodukte des INH nicht ausgeschlossen und danach weiter gesucht.

Das INH ist als Hydrazid-Derivat der Isonicotinsäure ein chemisch sehr reaktionsfähiges Molekül. Fast jede Reaktionsmöglichkeit ist zur Aufstellung einer eigenen Hypothese über den Wirkungsmechanismus herangezogen worden. Die wichtigsten Beobachtungen und Überlegungen, die sich zum Teil widersprechen, zum Teil in Form von Partialhypothesen gegenseitig ergänzen, sind von Nestler (15) zusammengefaßt worden. Man kann aus der großen Anzahl der bestehenden Hypothesen ersehen, wie umstritten der Wirkungsmechanismus des INH heutzutage noch ist.

Zu den interessantesten unter ihnen gehören diejenigen, die die INH-Wirkung als Wasserstoffperoxidwirkung deuten, wobei das vermehrte Auftreten von H_2O_2 in den Tuberkelbakterien auf verschiedenartige Ursachen zurückgeführt wird. Die Hypothese von Winder (16) nahm an, daß bei der intrazellulären Oxydation des INH H_2O_2 als Oxydationsprodukt entstehen soll. Dies wurde aus dem Auftreten von H_2O_2 bei der Oxydation von INH durch Luftsauerstoff in Gegenwart von Manganionen geschlossen.



Krüger-Thiemer (8) konnte beweisen, daß die Reaktion nach diesem Schema verläuft, in dem H_2O_2 als Nebenprodukt bei der Regeneration des Katalysators auftritt.

Auch Tirunarayanan und Vischer (17) vermuteten 1957, daß neben dem hypothetischen Dihydroxyisonicotinoylhydrazin H_2O_2 bei dem peroxydatischen Abbau des INH gebildet werden solle.

Nitti und Curci (1953) (18), Knox (1955) (19) sowie Maher, Speyer und Levine (1957) (20) führten die Vermehrung des H_2O_2 in den Zellen auf die Hemmung der Katalase durch INH zurück. Dem widerspricht der Befund von Bönicke (21), daß der stärkste INH-Antagonist Nicotinoylhydrazin, der dem INH isomer ist, Katalase ebenso stark hemmt wie INH.

Im Jahre 1957 veröffentlichte Krüger-Thiemer (4,22) eine weitere Hypothese zum Wirkungsmechanismus des INH, die nahezu alle experimentellen Beobachtungen vereinigt und widerspruchslos zu erklären scheint. Diese Hypothese enthält aber noch viele Schritte, die nicht experimentell bestätigt worden sind.

Nach dieser Hypothese löst nicht das INH selbst die Hemmwirkung aus, sondern INS, die innerhalb des Bakteriums aus dem INH durch oxydative Einwirkung eines Peroxydase-H_2O_2-Komplexes entsteht. INH kann als nicht ionisierte Verbindung die Bakterienzellmembran in beiden Richtungen relativ ungehindert durchdringen. Innerhalb der Zelle wird das Hydrazin dann oxydativ als Stickstoff abgespalten. Die auf diese Weise entstandene INS liegt im physiologischen pH-Bereich größtenteils

als Anion vor, das auf Grund seiner Prolarität die Zellwand schwer oder nur langsam durchdringt. Durch diesen Mechanismus wird die INS in der Zelle angereichert, solange ein genügender Vorrat an dem zur Oxydation erforderlichen POD-H_2O_2-Komplex vorhanden ist. Die INS-Konzentration erreicht auf diese Weise eine Höhe, die möglicherweise im gleichen Bereich liegt, in dem auch andere Chemotherapeutica wirksam sind.

Als Folge der erhöhten INS-Konzentration in der Zelle besteht ein kompetitiver Antagonismus zur Nicotinsäure bei dem Einbau in das Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD), ähnlich wie es Goldman (23) für das INH selbst vermutete. Aus neueren Arbeiten geht hervor, daß die Biosynthese des NAD über einen Einbau der Nicotinsäure mit erst nachfolgender Amidierung verlaufen kann (24,25).

Der weitere Reaktionsverlauf soll abgekürzt dargestellt werden: Das NAD-Analogon mit eingebauter INS kann die Coenzym-Funktion nicht mehr ausüben. So kommt es zu Störungen im Lipoidstoffwechsel und zur Anhäufung von H_2O_2. An dem gebildeten H_2O_2 geht schließlich das Bakterium zugrunde.

Auf der Grundlage eines solchen Mechanismus ist auch das Verhalten der gegen INH resistenten Mycobakterien verständlich. Da bei diesen Stämmen die POD fehlt, kann die Abspaltung des Hydrazins aus dem INH nicht erfolgen, daher kommt es nicht zur intrazellulären Anreicherung der INS und zu deren Einbau in das NAD.

Nach Krüger-Thiemer beruht die Wirksamkeit des INH auf dem in 4-Stellung substituierten Pyridinring als auch auf der Carboxyhydrazingruppe (26).

Da auf der Abbildung über die biochemischen Umwandlungsmöglichkeiten des INH nach Krüger-Thiemer noch viele chemisch-mögliche oder hypothetische Wege offen waren, wurden zusätzliche Untersuchungen durchgeführt, um weitere Kenntnisse von den chemischen Umwandlungsmöglichkeiten des INH zu erhalten.

Es wurde auch vermutet, daß durch Kofaktoren in Gegenwart von POD Hydroxylierungsprodukte gebildet werden könnten. Tirunarayanan und Vischer (17) vermuteten in ihrem Wirkungs-

mechanismus von INH ein Dihydroxyisonicotinsäurehydrazid. Zu diesem Zweck wurden zu den Reaktionsansätzen Dihydroxyfumarsäure (DHF), reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) beziehungsweise reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) als Kofaktoren hinzugegeben, weil Bekierkunst (27) festgestellt hat, daß geringe Mengen von NADH in Mycobacterium tuberculosis vorhanden waren. Auch die NAD-Hypothese nach Goldman (23) besagte, daß hier eine Ausdehnung der Untersuchungen interessant sein könnte.

II. ALLGEMEINER TEIL

A. Analytisch-dünnschichtchromatographische Trennung und Identifizierung der Substanzen

Diller, Krüger-Thiemer und Wempe (28) haben hierzu die Papierchromatographie herangezogen. Die neue Aufgabe bestand darin, ein schnelleres, empfindlicheres analytisches Trennungsverfahren zu finden. Somit wurde die Dünnschichtchromatographie gewählt.

Als Adsorbens hat sich am besten Kieselgel HF_{254} erwiesen, mit dem Fließmittel Aceton-Dioxan-25%igem Ammoniak (90:10:4) wurden die besten Trenneffekte erzielt.

Es hat sich gezeigt, daß das Laufmittel sich mit der Zeit verändert. Die besten Trennungen wurden mit 24 Std altem Laufmittel erzielt, wie es aus der Abb.2 zu ersehen ist.

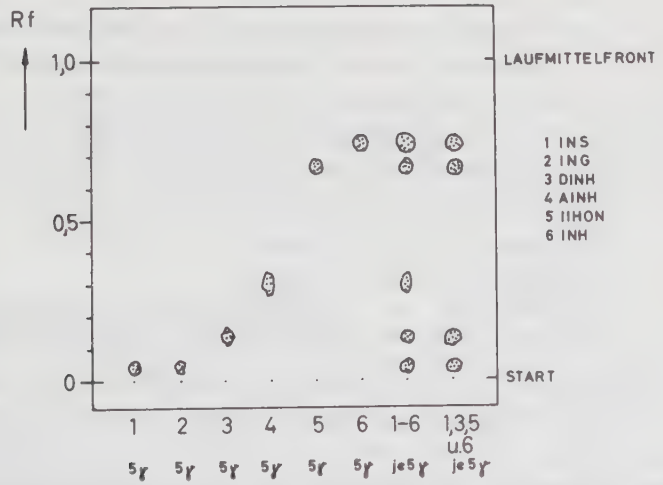


Abb.2 Dünnschichtchromatographische Auftrennung von INS, ING, DINH, AINH, IIHON, INH. Kieselgel/Aceton-Dioxan-25%iger Ammoniak (90:10:4). Erläuterung der Abk. siehe Tab. 1

Aus der Tab.1 sind die Mittelwerte der Rf-Werte der Substanzen aus dem frisch bereiteten, 24 Std und 48 Std alten Lauf-

mittel zu ersehen:

Substanzen	Rf-Werte aus den Laufmitteln		
	frisch bereit.	nach 24 Std.	nach 48 Std.
Isonicotinsäure (INS)	0,02	0,03	0,02
Isonicotinoylglycin (ING)	0,02	0,04	0,02
Diisonicotinoyl-hydrazin (DINH)	0,07	0,15	0,10
Acetyl-Isonicotinoylhydrazin(AINH)	0,15	0,37	0,26
N-Isonicotinoyl-N'-isonicotinalhydrazon (IIHON)	0,47	0,60	0,40
Isonicotinoylhydrazin (INH)	0,56	0,67	0,50

Tab.1 Rf-Mittelwerte der Substanzen

Als Sprühtest wurde das von Feigl (29) für Tüpfelreaktionen auf Hydrazinderivate, Nitroso-Verbindungen und ungesättigte Aldehyde verwandte Natrium-pentacyano-nitroso-ferroat als 1%ige wäßrige Lösung übernommen. Die Haltbarkeit des Detektionsmittels beträgt unter Lichtausschluß höchstens 48 Stunden. Die Substanzen haben folgende Farbreaktionen ergeben:

Substanz	Farbe
INS, ING	gelb
DINH, AINH	orange
INH	orange mit verblassendem grauen Rand
IIHON	rotbraun

Die Nachweisreaktion des Sprühtestes erwies sich als empfindlicher als die Markierung unter UV-Licht 254 nm. Die untere Nachweisbarkeitsgrenze kann für INH mit 0,4 µg = $3 \cdot 10^{-9}$ Mol angegeben werden. In der Arbeit der obigen Autoren wurde die Nachweisbarkeitsgrenze für INH bei der Papierchromatographie mit 6 µg $\approx 5 \cdot 10^{-8}$ Mol angegeben.

B. Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Oxydation des INH durch Peroxydase

In Anlehnung an die Untersuchung von Krüger-Thiemer (8) über den Wirkungsmodus des Isoniazids wurde mit folgendem Oxydationsansatz gearbeitet:

2 mg INH/ml in Phosphatpuffer pH 7 gelöst
0,25 mg H_2O_2/ml
1,15 mg POD/ml
bei einer Temperatur von 20°C.

Es wurde eine Menge von 30 µg bezogen auf die Einwaage des INH aufgetragen. Hierbei entstanden nach einer Reaktionszeit von 3 Stunden 4 Flecke auf dem Chromatogramm, die durch Vergleichssubstanzen identifiziert wurden als: INS, DINH, INH und einer unbekannten Substanz, die in der Arbeit fortan als Substanz x (Sx) bezeichnet wird. Peroxydase selbst ergibt keine Flecken und läuft nicht auf der Platte.

Es wurde untersucht, ob INH sich nur mit POD oxydieren läßt. Nach einer Reaktionszeit von 4 Stunden konnte keine Umsetzung dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden.

Ein Oxydationsansatz von INH und Wasserstoffperoxid (2 val bezogen auf INH Einwaage) ergab in den pH-Bereichen 4-9 eine schwache Oxydation nach 3 Stunden Reaktionsdauer. Es wurde geringfügig INS gefunden, nach 27 Stunden Reaktionsdauer trat noch IIHON und DINH im pH-Bereich 8 und 9 hinzu.

1.) Abhängigkeit vom pH-Wert

Die obigen Untersuchungen wurden über den pH-Bereich 3-9 ausgedehnt, hierbei entfällt die Untersuchung bei pH 3, weil bei pH 3 INH selbst unbeständig ist. Hierbei wurde IIHON im pH-Bereich 4-6 beobachtet.

Nach visuellen Schätzungen der Farbintensitäten der Flecke scheint die bei der Oxydation gebildete Menge der INS und des Fleckes der Sx im pH-Bereich 4-9 vom pH-Wert unabhängig zu sein; die Konzentration des IIHON nimmt mit steigendem pH-Wert ab, die des DINH dagegen zu.

Die Reaktionen wurden im Tageslicht wie in der Dunkelheit durchgeführt, auch waren die Versuche über einen längeren

Zeitraum bis zu 60 Stunden ausgedehnt worden. Es wurden aber keine abweichenden Ergebnisse festgestellt.

Die Untersuchungen bei pH 4 haben sich als günstig erwiesen, weil alle Oxydationsprodukte in Form der gebildeten Flecke auf der DC-Platte sehr deutlich sichtbar waren.

2.) Abhängigkeit von der Wasserstoffperoxid-Konzentration

Nach den vorhergehenden Untersuchungen wurde die folgende Versuchsreihe bei pH 4 durchgeführt. Es wurde folgender Ansatz bearbeitet:

0,05 ml POD-Lösg.=2 mg/ml
13,7 mg INH/ml in Natriumcitratpuffer pH 4 gelöst = 10^{-4} Mol
0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 ml m/10 H_2O_2
ergänzt wurde mit bidest. Wasser auf 4,1 ml Gesamtvolumen.

Diese verschiedenen Zugaben von H_2O_2 entsprechen 1 bis 6 Oxydationsäquivalenten bezogen auf 1 Mol INH. Die Oxydationsansätze wurden im Licht wie im Dunkeln durchgeführt, es ergaben sich aber keine sichtbar unterschiedlichen Ergebnisse. Eine weitere Steigerung der H_2O_2-Konzentration auf 5, 10, 15, 20 und 25 oxval ergab kaum einen Unterschied in der Beurteilung der Chromatogramme.

Eine zu große H_2O_2-Konzentration führt nach Weinryb (30) zur Hemmung der POD-Aktivität.

3.) Abhängigkeit von der Peroxydase-Konzentration

Eine sichtbare Zunahme der Oxydation, bezogen auf die Oxydationsprodukte, wurde durch eine Steigerung der POD-Konzentration erzielt. Aus der Tabelle 2 kann abgelesen werden, daß die Oxydation von INH in erster Linie von der POD-Konzentration abhängig ist.

Für die Ansätze wurden 10^{-4} Mol INH verwendet, aufgetragen wurde jeweils 30 µg bezogen auf INH Einwaage. Mit einer Erhöhung der H_2O_2-Konzentration ist es nicht gelungen, die Ausgangssubstanz vollständig zu oxydieren, ebenfalls konnte selbst bei einer wesentlichen Steigerung der POD-Menge keine vollständige Oxydation des INH erreicht werden. Andrejew, Gernez-Rieux und Tacquet bezeichnen INH als Inhibitor der POD (31).

POD Zugabe	Oxydationsäquivalente H_2O_2 bezogen auf 1 Mol INH				
	5	10	15	20	25
0,1 mg	IIHON INS,INH	INS,INH	INS,INH	INS,INH	Sx INS,INH
0,4 mg	IIHON INS,INH	IIHON INS,INH	INS,INH	INS,INH	Sx INS,INH
0,6 mg	IIHON INS,INH	IIHON INS,INH	IIHON INS,INH	INS,INH	Sx INS,INH
1,0 mg	IIHON INS,INH	IIHON INS,INH	IIHON INS,INH	IIHON INS,INH	IIHON,Sx INS,INH
1,6 mg	IIHON INS,INH	IIHON INS,INH	IIHON INS,INH	IIHON INS,INH	IIHON,Sx INS,INH
2,0 mg	IIHON INS,INH	IIHON INS,INH	IIHON INS,INH	IIHON,Sx INS,INH	IIHON,Sx INS,INH
2,8 mg	IIHON INS,INH	IIHON INS,INH	IIHON,Sx INS,INH	IIHON,Sx INS,INH	IIHON,Sx INS,INH
3,6 mg	IIHON INS,INH	IIHON,Sx INS,INH	IIHON,Sx INS,INH	IIHON,Sx INS,INH	IIHON,Sx INS,INH
4,4 mg	IIHON,Sx INS,INH	IIHON,Sx INS,INH	IIHON,Sx INS,INH	IIHON,Sx INS,INH	IIHON,Sx INS,INH
5,0 mg	-------INS-------INS-------IIHON------Sx----DINH				

Tab.2 Zusammenstellung der auftretenden Oxydationsprodukte in Abhängigkeit der Oxydationsäquivalente H_2O_2 und der POD-Konzentration

INS ist das Oxydationsprodukt, das sich am schnellsten bildet und mengenmäßig am stärksten auftritt. Das Entstehen von Sx scheint H_2O_2 abhängig zu sein. Aber auch hierbei kann durch die Zunahme der POD-Konzentration eine gesteigerte Bildung von Sx auf DC festgestellt werden. Während die Oxydation von INH zu IIHON bei geringer POD- und H_2O_2-Konzentration beobachtet wurde, erfolgte die Bildung der anderen dimeren Substanz DINH erst bei größerer POD-Zugabe.

4.) Kontinuierliche Peroxydase und Peroxydase-H_2O_2-Zugabe zu dem Ansatz während der Reaktion

Nach den bisherigen Versuchen liegt die Annahme nahe, daß bei der Oxydation mit einer Inhibition der POD gerechnet werden muß. Aus dieser Annahme heraus wurde jetzt zu einem Ansatz alle Stunde 1 mg POD bzw. zu einem zweiten Ansatz 1 mg POD und 0,2 ml m/10 H_2O_2 hinzugegeben. Die Ansätze

wurden über den pH-Bereich 4-8 ausgedehnt.

Der Ausgangsansatz lautete:

0,5 ml INH-Pufferlösg. = 6,82 mg INH = $5 \cdot 10^{-5}$ Mol
0,5 ml POD-Lösg. = 10 mg/ml
1,0 ml m/10 H_2O_2 = 4 oxval, bezogen auf 1 Mol INH.

Durch die Zugabe neuen Enzyms bzw. neuen Enzyms und H_2O_2 sollte eine quantitative Umsetzung von INH erreicht werden. Nach sechsfacher Zugabe von POD bzw. POD-H_2O_2 über 9 Std (der Ausgangsansatz wurde 3 Std der Reaktion ausgesetzt, anschließend erfolgte alle Stunde die Zugabe) wurde eine quantitative Oxydation von INH nicht erreicht. Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden vor jeder erneuten Zugabe ausgeführt.

5.) Halbquantitative Untersuchungen über die Zusammensetzung des Oxydationsansatzes

Da es nicht gelungen ist, INH quantitativ zu oxydieren, sei es durch Erhöhung der H_2O_2-Konzentration bzw. durch Steigerung der POD-Zugabe, soll nun herausgefunden werden, in welchem Mengenverhältnis die einzelnen Oxydationsprodukte und INH vorliegen. Nach folgendem Ansatz wurde der Versuch durchgeführt:

0,5 ml INH-Pufferlösg. pH 4-8 = 6,85 mg INH = $5 \cdot 10^{-5}$ Mol
2,0 ml POD-Lösg. = 20,1 mg POD
2,5 ml m/10 H_2O_2 = 10 oxval, bezogen auf 1 Mol INH.

Nach 3 Std Reaktionszeit sind die Ergebnisse in der Tab. 3 zusammengefaßt.

Das Oxydationsprodukt, das am häufigsten auftritt, ist INS vor DINH und stellt mengenmäßig zugleich den Hauptanteil dar. Dieses Ergebnis konnte bereits aus der Tab. 2 gefolgert werden. Die Bildung des IIHON ist, wie aus der Tab. 3 zu ersehen, im sauren Bereich stärker, während im alkalischen Bereich DINH überwiegt. Substanz Sx tritt zwar bei allen pH-Werten gleichmäßig, aber im ganzen gesehen am schwächsten auf.

Diese dünnschichtchromatographischen Untersuchungen sollen zeigen, welche Oxydationsansätze und unter welchen Reak-

tionsbedingungen die günstigsten Voraussetzungen geschafft werden, um Sx, die entstanden ist, zu isolieren und aufzuklären.

Aufgetragene Menge auf INH Einw.bez.	Tageslichtreaktion				
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
1,35 µg	INS, (DINH), IIHON	INS, DINH, IIHON	INS,INH, DINH, (IIHON)	INS,INH DINH	INS,INH, DINH
2,7 µg	INS,INH, (DINH), IIHON,Sx	INS,INH, DINH, IIHON,Sx	INS,INH, DINH, IIHON,Sx	INS,INH, DINH, Sx	INS,INH, DINH, Sx
5,4 µg	INS,INH, DINH, IIHON,Sx	INS,INH, DINH, IIHON,Sx	INS,INH, DINH, IIHON,Sx	INS,INH, DINH, Sx	INS,INH, DINH, Sx
	Vor Licht geschützte Reaktion				
1,35 µg	INS, DINH	INS, DINH, (IIHON)	INS, DINH, (IIHON)	INS, DINH,	INS, DINH
2,7 µg	INS,INH, DINH, IIHON,Sx	INS,INH, DINH, IIHON,Sx	INS,INH, DINH, (IIHON)Sx	INS,INH, DINH, Sx	INS,INH, DINH, Sx
5,4 µg	INS,INH, DINH, IIHON,Sx	INS,INH, DINH, IIHON,Sx	INS,INH, DINH, IIHON,Sx	INS,INH, DINH, Sx	INS,INH, DINH, Sx

Tab.3 Halbquantitative Aussage über das Auftreten der Oxydationsprodukte im Ansatz

C. Spektralphotometrische Untersuchungen im UV-Bereich

1.) UV-Spektren der Substanzen

Die Meßlösungen wurden aus Ausgangslösungen hergestellt, die Substanzen wurden alle im bidestillierten Wasser gelöst. Die Meßwerte sind in der Tab.4 wiedergegeben:

Substanz	Mol/L	Maxima			Minima
		E^{10-4}_{1cm}	ε [L/Mol·cm]	λ (nm)	λ (nm)
INH	10^{-4}	0,40	$4{,}0 \cdot 10^{3}$	263	225-240
DINH	10^{-4}	0,64	$6{,}4 \cdot 10^{3}$	266	250
INS	10^{-4}	0,40	$4{,}0 \cdot 10^{3}$	263	234
IIHON	$2{,}5 \cdot 10^{-5}$	1,70	$1{,}7 \cdot 10^{4}$	290	234-236

Tab.4 Meßwerte der Absorptionsspektren von INH, DINH, INS, IIHON

In der Abb.3 sind die Kurvenverläufe der Substanzen aufgetragen. Die Maxima von INH und INS fallen aufeinander, das von DINH ist geringfügig bathochrom verändert worden gegenüber INH. Das Maximum von IIHON ist sehr stark in den langwelligeren Bereich gerückt. Die Extinktion von IIHON beträgt etwa das Vierfache von INH.

2.) Spektren der Reaktionslösungen nach der Oxydation

Eine kinetische Messung, bei der die Abnahme von INH während der Oxydation aufgezeichnet wird, war leider nicht möglich, da die Kurven der Oxydationsprodukte mit INH sehr ähnlich waren. Auch das geringe Auftreten der Oxydationsprodukte ließ keine wesentliche Änderung des INH-Spektrums eintreten.

Da aber eine Änderung des Kurvenverlaufs durch die Bildung von IIHON erwartet wurde, wurden die Oxydationsansätze untersucht, die für die Dünnschichtchromatographie bestimmt waren.

Ansatz:
0,5 ml INH-Pufferlösg. pH-Bereich 4-8, 6,85 mg INH = $5 \cdot 10^{-5}$ Mol
2,0 ml POD-Lösg. = 20,1 mg POD
2,5 ml m/10 H_2O_2 = 5 oxval

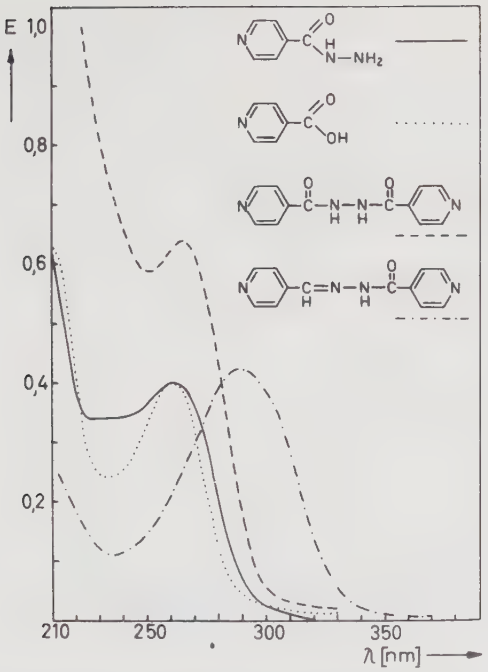


Abb.3 Absorptionsspektren von INH, DINH, INS, IIHON in H_2O. Konzentrationen siehe Tab. 4.

Vergleichslösung:
0,5 ml Pufferlösung pH-Bereich 4-8
2,0 ml POD-Lösg. = 20,1 mg POD
2,5 ml m/10 H_2O_2

Von jedem Ansatz wurden 0,1 ml (137 µg INH) entnommen und auf 10 ml verdünnt.

Die Kurven aus den Oxydationsansätzen mit den pH-Werten 4,5 und 6 haben zwischen 300 bis 320 nm eine Schulter, die vom gebildeten IIHON herrührt, da dessen Maximum am stärksten nach dem langwelligeren Bereich verändert war. Die Schulter ist bei pH 6 nur noch schwach, bei pH 7 nicht mehr ausgebildet. Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen finden hierin ihre Bestätigung. Die Abb.4 zeigt noch einmal die Kurvenverläufe.

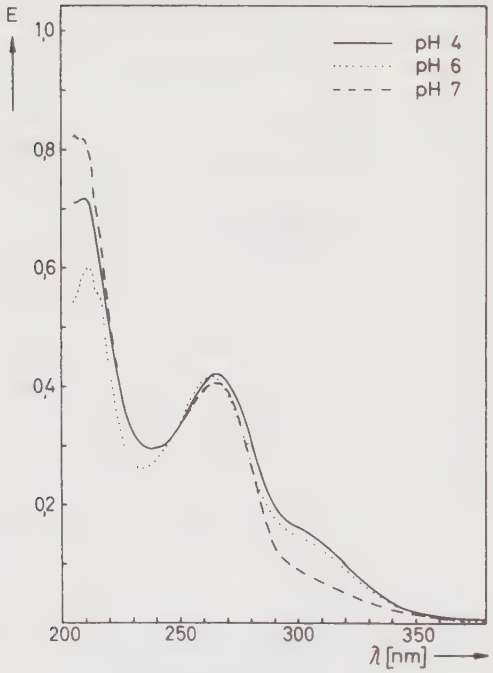


Abb.4 Absorptionsspektren der Reaktionslösungen mit den pH-Werten 4, 6 und 7 nach der Oxydation

Die Maxima der Kurven lagen im Bereich von 264-266 nm. In diesem Bereich lagen auch die Maxima der UV-Spektren von INH, INS und DINH. Die Minima der Kurven lagen zwischen 234-239 nm. Die Ausgangssubstanz INH hat dagegen ein Minimum bei 225-240 nm.

Diese Untersuchung wurde auf Oxydationsansätze ausgedehnt, die im Tageslicht bzw. in der Dunkelheit durchgeführt wurden. Auch hierbei wurde wieder festgestellt, daß ein Unterschied nicht meßbar hervorgetreten ist.

Zum Vergleich wurde im späteren Verlauf der Arbeit, nachdem das unbekannte Oxydationsprodukt Sx als Isonicotinsäureamid (INA) identifiziert wurde, ein Gemisch aus INH und seinen Oxydationsprodukten zur Vergleichslösung herangezogen:

0,6 ml INH-Lösg. (10^{-6} Mol/ml)
0,1 ml DINH-Lösg. "
0,1 ml IIHON-Lösg. "
0,1 ml INS-Lösg. "
0,1 ml INA-Lösg. "

Dabei wurde angenommen, daß sich ungefähr 40% von INH umgesetzt hat und daß sich alle Oxydationsprodukte gleichmäßig gebildet haben. Der Kurvenverlauf zeigte, wie in Abb.5 ersichtlich, deutliche Ähnlichkeit mit den Kurven der Abb.4

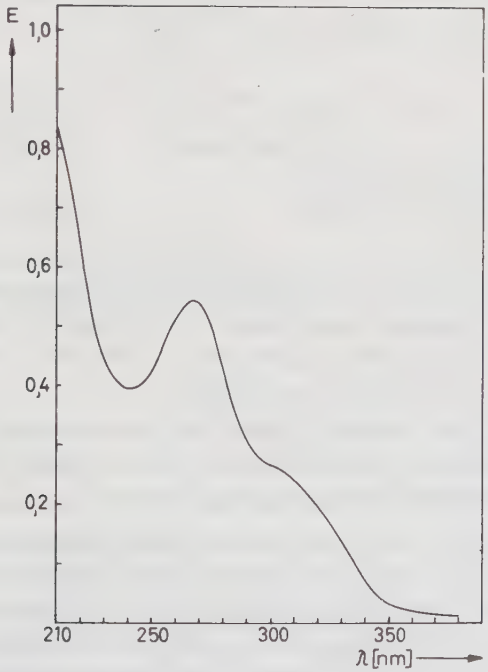


Abb.5 Absorptionsspektrum einer Vergleichslösung, die aus den Oxydationsprodukten und INH besteht

im pH-Bereich 4-6. Das Maximum lag bei 268 nm, das Minimum bei 241 nm und eine schwach ausgebildete Extinktionserhöhung bei 300-320 nm.

3.) Untersuchungen über die Inhibition der Peroxydase durch INH und seine Oxydationsprodukte

Wie sich bei den bisherigen Untersuchungen herausgestellt hat, ist erst bei höherer Einwaage von POD eine bessere Umsetzung von INH erzielt worden. Es wurde hierbei angenommen, daß die POD von INH oder einem seiner Oxydationsprodukte inhibiert wird. Um diese Vermutung bestätigt zu finden, wurden POD-Aktivitätsbestimmungen nach der Chance-Maehly-Methode (32) in Gegenwart von INH und seinen Oxydationsprodukten durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Oxydation von Guajakol.

Für die Messung wurden folgende Meßlösungen hergestellt:

2,9 ml Puffer pH 7, 0,01 m Phosphatpuffer
0,03 ml POD-Lösg. = 1,8 µg POD
0,05 ml 0,02 m Guajakol-Lösg.
0,02 ml 0,04 n H_2O_2 (F=1,002).

In dem Puffer waren jeweils die entsprechenden Substanzen gelöst, davon wurde soviel Puffer-Substanz-Lösg. entnommen, wie es für den entsprechenden Versuch erforderlich war. Die nun noch verbleibende Menge wurde mit Puffer pH 7 (ohne gelöste Substanz) auf 2,9 ml gebracht.

Die Vergleichslösung enthielt bidestilliertes Wasser. Die Messung wurde genauso gehandhabt, wie die im experimentellen Teil angegebene Aktivitätsbestimmung von POD.

In der Versuchsreihe wurde die INH-Zugabe folgendermaßen gesteigert: 13,7, 27,4, 55,0, 110,0, 165,0 und 220 µg INH. Für die verschiedenen INH-Konzentrationen wurden Kurven in Abhängigkeit von der Reaktionszeit und der Extinktion aufgezeichnet. Die Kurven sind in der Abb.6 zusammengefaßt.

Die Bildung der Oxydationsprodukte des Guajakols wird durch die Extinktion gemessen. Bei steigender INH-Zugabe erreichten die Kurven in kürzerer Zeit und bei niedrigerer Extinktion ihr Maximum.

Saunders (33) gelang 1957 der Nachweis, daß bei der Oxydation des Guajakols durch Peroxydase ein Gemisch oxydierter Tetrahydroxydiphenyle entstand. Das Gemisch hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 470 nm. Nach Chance

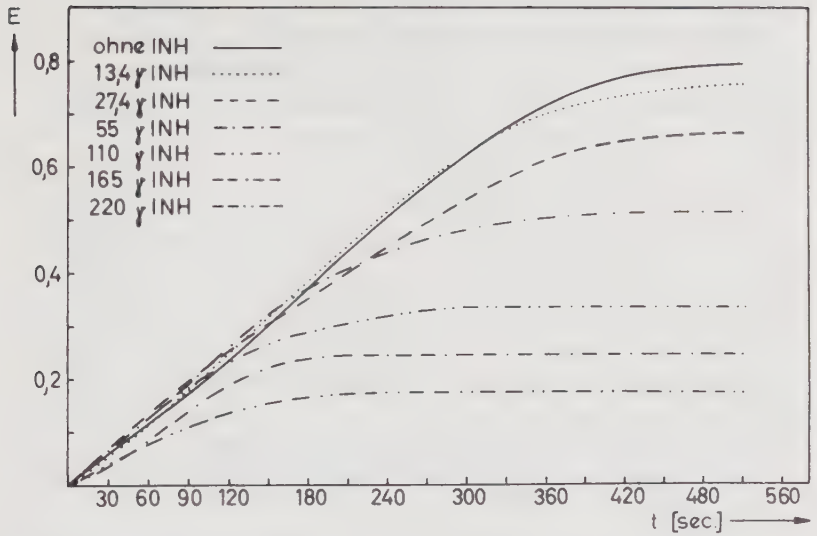


Abb.6 Messung der Extinktion bei der Oxydation von Guajakol nach der Aktivitätsbestimmung von Chance und Maehly in Gegenwart von INH in Abhängigkeit von der Zeit

und Maehly wird jetzt die Zeit ermittelt, um die Extinktion der Reaktionslösung von pH 7 bei 470 nm um 0,050 zu erhöhen. Die Anfangskonzentration von Guajakol und H_2O_2 blieb gleich.

Aus der Formel zur Berechnung der Fermentkonzentration kann man auch die Geschwindigkeitskonstante k_4 berechnen, wenn die Fermentkonzentration konstant ist. k_4 ist die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion des POD-H_2O_2-Komplexes I mit dem Wasserstoffdonator und ist unter den gegebenen Konzentrationsverhältnissen für die Gesamtreaktion geschwindigkeitsbestimmend.

$$e = \frac{\Delta x}{k_4 \cdot a \cdot \Delta t} \qquad k_4 = \frac{\Delta x}{e \cdot a \cdot \Delta t}$$

Hierbei lautet:

e = Enzymkonzentration in Mol/L
a = Anfangskonzentration des Guajakols = $3{,}33 \cdot 10^{-4}$ Mol/L
k_4 = Geschwindigkeitskonstante = $3{,}3 \cdot 10^5$ L/Mol·sec (bei 25°C)
Δx = Änderung der H_2O_2-Konzentration während der Messung = $7{,}52 \cdot 10^{-6}$ Mol/L
Δt = Zeit in Sekunden für die Erhöhung der Extinktion um 0,050 Einheiten.

4.) Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k_4^* für die Inhibitionsuntersuchungen von INH an POD

Der Wert k_4^* bedeutet nun die Geschwindigkeitskonstante in der Versuchsreihe mit INH. In Verbindung mit dieser Methode wurde bei der Bestimmung mit INH der Wert:

$$k_4^* = \frac{\Delta x}{\Delta t \,.\, a \,.\, e}$$

eingesetzt, k_4^* berechnet sich für die jeweilige INH-Zugabe:

$$k_4^* = \frac{96{,}1 \cdot 10^5}{\Delta t}, \text{ da } k_4 = \frac{7{,}52 \cdot 10^{-6}}{3{,}33 \cdot 10^{-4} \cdot 2{,}35 \cdot 10^{-9}} \cdot \frac{1}{\Delta t}$$

Die k_4^*-Werte sind in der Tab.5 niedergeschrieben:

INH-Menge	k_4^* [L/Mol·sec]	Δt Mittelwerte
13,7 µg	$3{,}21 \cdot 10^5$	29,9"
27,4 µg	$3{,}13 \cdot 10^5$	30,7"
55,0 µg	$3{,}11 \cdot 10^5$	30,9"
110,0 µg	$3{,}02 \cdot 10^5$	31,8"
165,0 µg	$2{,}56 \cdot 10^5$	37,1"
220,0 µg	$2{,}23 \cdot 10^5$	43,2"

Tab.5 k_4^*-Werte von INH aus den Inhibitionsversuchen an POD

Die Geschwindigkeitskonstante nimmt bei höherer INH-Zugabe laufend weiter ab, da der Δt-Wert entsprechend zunimmt. Aus der Tab.5 kann auch gesehen werden, daß die Umsetzung des Guajakols langsamer mit erhöhter INH-Zugabe erfolgt, wie die verlängerte Reaktionszeit Δt für die Extinktionsänderung um 0,050 Einheiten zum Ausdruck bringt.

Wie aus der Abb.7 ersichtlich ist, fällt die Geschwindigkeitskonstante bis zu einer Menge 27,4 µg INH ab, zwischen den Zugaben von 55 und 110 µg INH gleichmäßig abgeschwächt, bei weiterer INH-Zugabe fällt die Kurve steil ab.

Unter den gleichen Bedingungen wurden dünnschichtchromatographische Untersuchungen vorgenommen, um herauszufinden, inwieweit INH innerhalb des kurzen Reaktionszeitraumes eben-

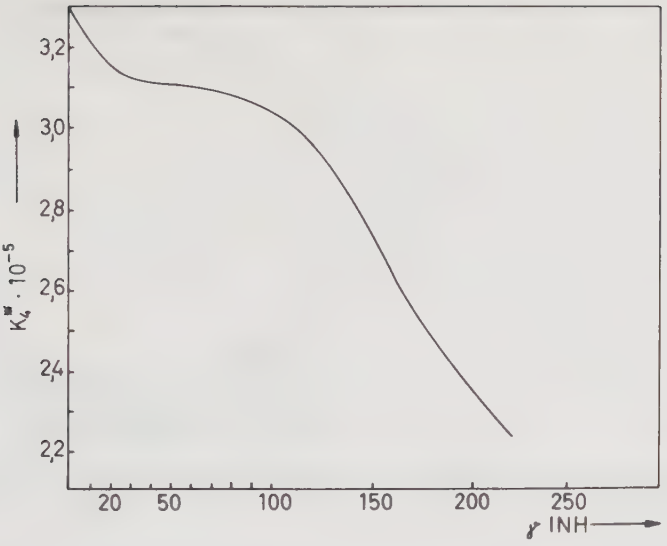


Abb.7 Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k_4^* von der INH-Konzentration

falls oxydiert wird und dadurch eine Konkurrenzreaktion zu Guajakol darstellt. Bei einer aufgetragenen Menge von 50 µg bezogen auf INH-Einwaage konnten sehr schwach INS, DINH und INA nachgewiesen werden. Bei einer aufgetragenen Menge von 100 µg wurde auch noch IIHON identifiziert. Guajakol selbst läuft auf der Platte nicht und gibt beim Detektieren keine Flecke.

Da bei der Oxydation von INH H_2O_2 verbraucht wird, also bei der Oxydation des Guajakols dadurch weniger zur Verfügung steht, wurde die H_2O_2-Konzentration vergrößert:

Für 13,7 µg INH-Zugabe 0,02 ml 0,08 n H_2O_2 ($1{,}6 \cdot 10^{-6}$ val)
Für 27,4 µg INH-Zugabe 0,02 ml 0,12 n H_2O_2 ($2{,}4 \cdot 10^{-6}$ val)
Für 55,0 µg INH-Zugabe 0,02 ml 0,20 n H_2O_2 ($4{,}0 \cdot 10^{-6}$ val)

Die Extinktionswerte, die nach vollständigem Verbrauch des H_2O_2 erreicht wurden, liegen bei den ersten beiden Ansätzen über dem Wert, der unter den Normalbedingungen ohne Zusatz von INH gemessen wurde. Das Guajakol wird durch den erhöhten H_2O_2-Zusatz stärker oxydiert. Durch eine weitere Steigerung

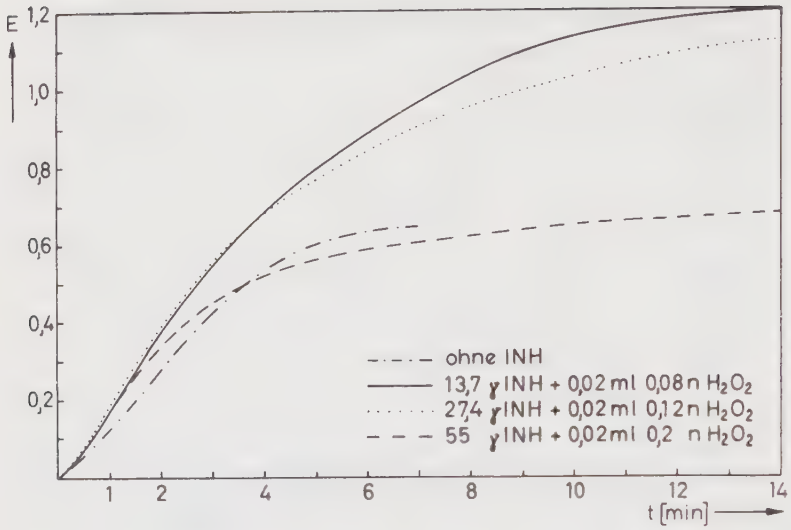


Abb.8 Extinktions-Zeit-Kurven von POD-Aktivitätsbestimmungen in Gegenwart verschiedener INH-Mengen bei erhöhter H_2O_2-Zugabe.

der zugesetzten INH-Menge wird aber auch die INH-Oxydation beschleunigt, so daß die Extinktionsendwerte wieder abfallen. Ein konstanter Endwert wird auch unter diesen Bedingungen nicht erreicht, Abb.8.

Danach wurde dem Ansatz zur Aktivitätsbestimmung von POD unter Beisein von INH nach deren E-Höchstwert eine zweite Menge von 0,02 ml 0,04 n H_2O_2 hinzugegeben. Nach der Zugabe stieg die Extinktion an, um aber auch bald den Höchstwert zu erreichen. Das Ferment war also noch aktiv. Diese Feststellung erläutert Abb. 9

Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen kann gefolgert werden, daß eine Konkurrenzreaktion der Wasserstoffdonatoren eingetreten ist. Eine Inhibition der POD ist demnach fraglich, eine eindeutige Entscheidung kann durch diese Versuche nicht gefällt werden. Die gleichen Untersuchungen wurden auf die Oxydationsprodukte des INH ausgedehnt. Hierbei konnten DINH und IIHON als Inhibitoren (34) von POD nicht mehr be-

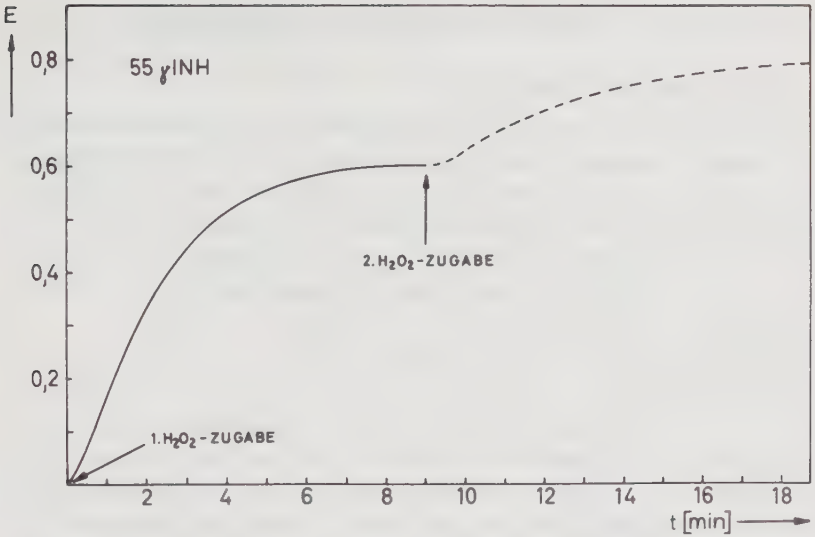


Abb.9 Extinktions-Zeit-Kurven einer POD-Aktivitätsbestimmung in Gegenwart von INH bei zweimaliger H_2O_2-Zugabe von 0,02 ml 0,04 n H_2O_2

stätigt werden. Die Oxydationsgeschwindigkeit von Guajakol in Gegenwart von INS, INA, DINH und IIHON und die Extinktionsendwerte blieben unverändert, wie aus der Tab.6 zu ersehen ist.

Substanz	Menge	t	E Endwert
INS	12,4 µg	31,2"	0,770
	25 µg	31,9"	0,770
	50 µg	32,1"	0,785
	124 µg	31,2"	0,770
INA	12,2 µg	30,7"	0,770
	24,4 µg	30,6"	0,775
	48,8 µg	32,4"	0,775
	122 µg	31,3"	0,750
DINH	24,4 µg	32,5"	0,785
	48,8 µg	31,3"	0,765
	97,6 µg	30,9"	0,760
	242 µg	32,5"	0,760
IIHON	22,6 µg	31,8"	0,770
	45 µg	31,4"	0,790
	90 µg	30,9"	0,785
	226 µg	31,2"	0,755

Tab.6 Durchschnittswerte aus den Inhibitionsuntersuchungen von INS, INA, DINH und IIHON an POD

D. Isolierung und Strukturaufklärung der Substanz Sx

1.) Isolierung der Substanz Sx

Aus den im Abschnitt II B beschriebenen Untersuchungen wurde der Oxydationsansatz abgeleitet, um daraus die Substanz Sx zu isolieren. Der Puffer wurde bei diesem Ansatz weggelassen, weil das unbekannte Oxydationsprodukt im pH-Bereich 4-9 gleichmäßig auftrat. Dadurch wurde die Isolierung erleichtert. Der Großansatz war wie folgt zusammengesetzt:

598 mg INH in 75 ml bidest. Wasser gelöst
605 mg POD in 60 ml bidest. Wasser gelöst
90 ml m/10 H_2O_2

Nach 18 stündiger Reaktionszeit wurde lyophilisiert, mit wenig Methanol aufgenommen und mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Kieselgel HF_{254}, Aceton) aufgetrennt. Nach dem Umkristallisieren aus Benzol betrug die Ausbeute 9,8 mg Sx.

2.) Identität- und Reinheitsprüfung der Substanz Sx

Da sich der Verdacht ergab, daß die isolierte Substanz Isonicotinoylamid (INA) darstellt, wurde Sx mit authentischem INA verglichen.

Die Stickstoffbestimmung ergab:

berechnet: 22,92% N
gefunden: INA fermentativ gewonnen : 22,49% N
INA synthetisch dargestellt: 23,06% N

Schmelzpunkt:

INA (fermentativ): 152°C
INA (synthetisch): 152°C
Mischschmelzpunkt: 152°C

UV-Spektrum: Abb.10

INA (fermentativ): 10^{-4}Mol/L, Maximum bei 269 nm, E = 0,245, $\epsilon = 2{,}5 \cdot 10^3$ [L/Mol·cm], Minimum bei 245 nm.
INA (synthetisch): 10^{-4}Mol/L, Maximum bei 268,5 nm E = 0,236, $\epsilon = 2{,}4 \cdot 10^3$ [L/Mol·cm], Minimum bei 246 nm.

IR-Spektrum: Abb.11

Das IR-Spektrum zeigt eine Carbonylbande bei 1675 cm^{-1} (Amid I) eine Amid-II-Bande bei 1630 cm^{-1}. Die IR-Spektren von INA (fermentativ) und INA (synthetisch) waren miteinan-

der identisch. Weitere Erläuterungen sind in dem Kapitel "IR-Spektren" gegeben.

Die Rf-Werte waren für beide Substanzen identisch.

Damit ist bewiesen, daß die Substanz Sx Isonicotinoylamid darstellt.

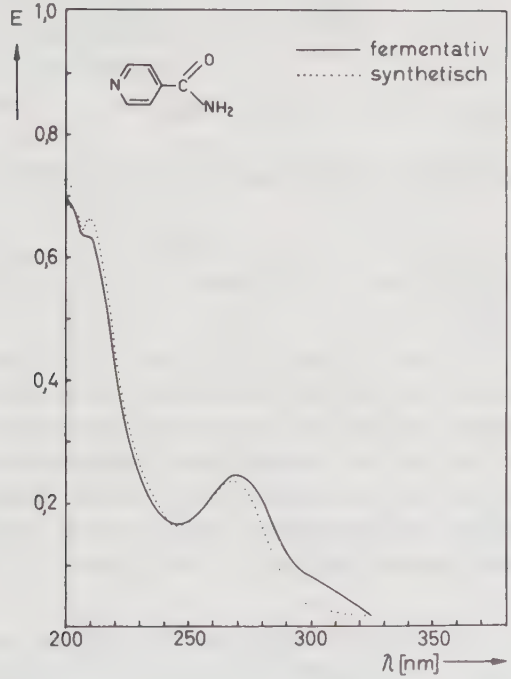


Abb.10 Absorptionsspektren von INA (fermentativ) und INA (synthetisch) 10^{-4} Mol/L in bidest. Wasser

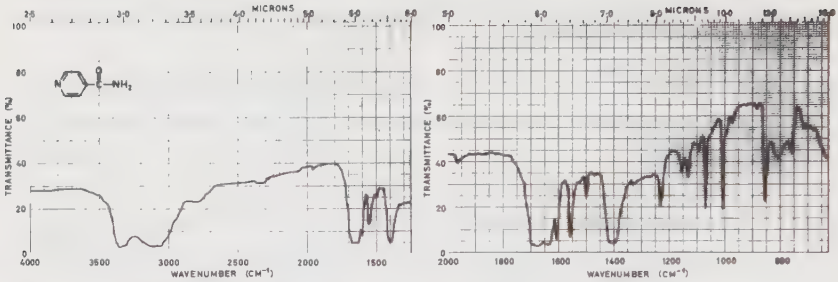


Abb.11 IR-Spektrum von INA (fermentativ) 1,5 mg in KBr.

3.) Untersuchungen über die Bildung von INA aus INS und Ammoniak

Es ist die Frage gestellt worden, ob INA als nucleophile Reaktion des im Laufmittel enthaltenen NH_3 mit INH (35) entstanden sein könnte.

Krüger-Thiemer, Diller und Wempe (28) hatten bei der Papierchromatographie des INH mit ammoniakhaltigem Laufmittel (Isopropanol:Ammoniak 25%, 85:15) INA als Umsetzungsprodukt beobachtet. Da bei der präparativen Schichtchromatographie nur reines Aceton als Laufmittel verwendet wurde, ist so die Bildung des INA während der fermentativen Reaktion ohnehin bewiesen. Dennoch wurden folgende Tests durchgeführt.

Wird reine INS mit dem ammoniakhaltigen Laufmittel chromatographiert, so kann ein dem INA entsprechender Fleck nicht nachgewiesen werden. Die Laufzeit einer DC-Platte betrug ca. 35-40 Minuten. In dieser Zeit veränderte sich die Substanz während der Entwicklungszeit nicht. Auch in einer Lösung von INS, INH, DINH oder IIHON in Dioxan-Aceton-Ammoniak (10:90:4 v/v) konnte nach 40 Minuten langem Stehen kein INA beobachtet werden.

4.) Anwendung der Peroxydase-H_2O_2-Reaktion auf die einzelnen Oxydationsprodukte

Hierbei sollte die Frage geklärt werden, ob INA vielleicht nur ein Zwischenprodukt ist.

Ein Reaktionsansatz aus jeweils 3 mg INS, INA, DINH, IIHON in 1 ml Puffer (pH 4-8) aufgenommen, 1 ml m/10 H_2O_2 und 0,5 ml POD-Lösg. (3 mg POD) hinzugegeben, ergab, daß sämtliche Produkte sich nicht weiter verändert haben und als Endprodukte aufzufassen sind. Hiermit wird auch Albert und Rees (9) widersprochen, die DINH als Zwischenprodukt bei der Umsetzung von INH zu INS angesehen haben.

Die Untersuchungen wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie durchgeführt.

E. Suche nach einer quantitativen Trennungs- und Bestimmungsmethode

1.) Säulenchromatographie

Mit Hilfe von saurem,neutralem und basischem Aluminiumoxid war es nicht gelungen, das Reaktionsgemisch, sei es durch fraktionierte Eluierung oder durch Auswaschen mit verschiedenen Lösungsmitteln, quantitativ aufzutrennen.

Weitere Versuche wurden mit Kieselgel (0,2-0,5 mm) und dem erprobten Fließmittel für DC wie auch mit anderen Lösungsmitteln der eluotropen Reihe unternommen. Auch mit diesem Sorbens fiel der Versuch unbefriedigend aus.

Eine Möglichkeit bildete die Anwendung von Cellulose-Ionenaustauschern. Eine Auftrennung wurde auch hierbei nicht erzielt.

Weiterhin boten sich die Anionen- und Kationenaustauscher an, die von Peters, Miller und Brown (36) zur Bestimmung von INH und seiner Stoffwechselprodukte in Urin angewandt wurden. Es wurden die Ionenaustauscher Merck I, Amberlite IR 120 und Merck III ohne Erfolg ausprobiert.

2.) Kombination von DC mit UV-Messungen

Das Reaktionsgemisch wurde mit Hilfe von DC (Kieselgel G) aufgetrennt. Nach der Elution wurden UV-Spektren aufgenommen, die sich aber gegenüber den Spektren der Reinsubstanzen verändert hatten, weil durch die Elution noch Kieselgel anwesend war. Die Markierung erfolgte unter UV-Licht.

Die Substanzen wurden mit dem Ferroat-Sprühtest markiert, von der Platte eluiert und davon ein Spektrum aufgenommen. Während bei den nicht angesprühten Substanzen die Maxima - wie schon vorher erläutert - alle dicht beieinander lagen, hatten die mit dem Ferroat angesprühten Substanzen ein verändertes Maximum, wie aus der Tab.7 ersichtlich.

Erschwerend kommt noch hinzu, daß die angesprühten Substanzen in kurzer Zeit verblassen, so daß auch hier eine quantitative Bestimmung mit genügender Genauigkeit nicht durch-

Ferroat-Sprühreagenz					λ max 409-450 nm
INH	angesprüht	mit	Ferroat	"	436 nm
INS	"	"	"	"	400 nm
IIHON	"	"	"	"	482 nm
DINH	"	"	"	"	452 nm
INA	"	"	"	"	440 nm

Tab.7 UV-Maxima, der mit Ferroat-Reagenz versetzten Substanzen

führbar ist. Die obigen Werte wurden dadurch erzielt, daß die authentischen Substanzen in bidestilliertem Wasser aufgelöst wurden und mit 0,01 m Ferroat-Lösung versetzt wurden.

3.) Fällung der Substanzen mit Hilfe von Metallionen

INH ist in der Lage, Komplexe mit Metallionen zu bilden (37). Die sich mit INH verbindenden Metalle stehen in den Gruppen VIIa, VIII, Ib und IIb des periodischen Systems der Elemente. Ciogolea, Morait, Teodoresen und Petroniu (38) haben eine Strukturformel für den Cu-Komplex des INH formuliert.

Hierauf fußend sollte eine gravimetrische Bestimmungsmethode gefunden werden. Es wurden folgende Metallsalze in verdünnten Lösungen benutzt:

$CuSO_4$: hauptsächliche Fällung von DINH, nebenbei IIHON, INH.
$HgNO_3$: sofortige Fällung von DINH, nebenbei IIHON, INH.
$AgNO_3$: sofortige Fällung von DINH, nebenbei IIHON.

Bei $NiCl_2$, $CoCl_2$, $MnCl_2$, $ZnSO_4$ und $CdSO_4$ wurden keine Fällungen erhalten.

Auch durch diese Verfahren wurde keine anwendbare Methode zur quantitativen Bestimmung gefunden.

4.) Titrationsmethoden

Nach Modrzejewski und Zommer (39) wurde versucht eine bromatometrische Titration der einzelnen Substanzen und des Reaktionsgemisches durchzuführen. Hierbei haben sich

INH, DINH und IIHON titrieren lassen. Beide Autoren haben die Titration nur an INH durchgeführt. Aus diesem Grunde konnte die Titration nicht zur quantitativen Bestimmung eines Reaktionsgemisches aus sehr ähnlichen Substanzen herangezogen werden.

Auch die potentiometrische Titration würde nur eine ungenaue Aussage ergeben, weil die Potentialsprünge zu gering erscheinen.

5.) Gaschromatographie

Für eine quantitative Bestimmung wurde noch die Gaschromatographie in Betracht gezogen. Eine Untersuchung der Hitzebeständigkeit der Substanzen ergab, daß sich die Substanzen bei dem Schmelzpunkt von INS zersetzen. Um eine Messung des Substanzgemisches im Gaschromatographen durchführen zu können, ist erhebliche Energie erforderlich. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der über ihren Schmelzpunkt hinaus erhitzten Substanzen ergaben, daß von INH 7, INA 3, DINH 4, IIHON 9 und INS 4 Flecke nachweisbar waren. Wegen dieser Hitzeempfindlichkeit konnte die Gaschromatographie nicht zur quantitativen Bestimmung herangezogen werden.

F. Infrarot-Spektren der Substanzen

Die wichtigsten Schwingungsbereiche einzelner, charakteristischer Molekülgruppen aus den Substanzen sind in der Tab.8 zusammengestellt.

Schwingungsbereiche cm^{-1}	Substanzen				
	INS	INA	INH	DINH	IIHON
ν CO	1725	1675	1675	1660-1700	1695
Amid-II δ NH		1630	1560	1540-1560	1575
ν NH		3190, 3380	3120, 3310	3200, 3440	3200
νCH aus CHO					2850
>C=C< aromatisch	1470-1490 1570,1620	1500, 1560,1600	1495, 1610	1505, 1610	1500, 1610
C-H aromatisch	3060	3060	3060	3070	3010
out-of-plane Schwingg.der aromatisch.R.	678, 770	678, 760	678, 750	690, 750	695, 750

Tab.8 Charakteristische IR-Banden von INH und seinen Reaktionsprodukten

1.) Spektrum von INS

Die Carbonyl-Bande ν CO befindet sich bei 1725 cm^{-1} in sehr breiter Form, die OH-Bande liegt bei 3440 cm^{-1}, Abb.12.

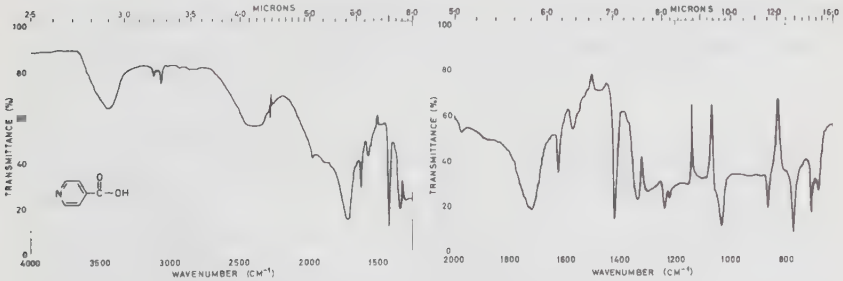


Abb.12 IR-Spektrum von INS 1,0 mg in KBr.

2.) Spektrum von INA

Die charakteristische Amid-I-Bande ν CO erscheint sehr breit bei 1675 cm^{-1}. Für Carbonylschwingungen ist das ein relativ niedriger Wert, wenn z.B. mit INS verglichen wird, und erklärt sich aus der bekannten Neigung des Stickstoffs zur Abgabe eines Elektrons. Das heißt, für einen beachtlichen Prozentsatz der Säureamid-Gruppe muß eine Resonanzstruktur der Form

angenommen werden, die der Carbonylgruppe eine Zwischenstellung zwischen einer Doppel- und einer Einfachbindung verleiht. Hierin ist die Ursache zu suchen, weshalb die Bande eine breite Struktur besitzt (40).

Alle primären Amide zeigen eine Amid-II-Bande von geringerer Intensität ziemlich dicht bei der Carbonylabsorption, gewöhnlich ist ihre Stärke ein Drittel bis ein Halb von der CO-Bande und sie liegt auf der Seite der niedrigeren Frequenz im Bereich 1620-1650 cm^{-1} (41), für INA wurde sie bei 1630 cm^{-1} gemessen. Die δ NH-Schwingung liegt damit im Bereich der Amid-II-Absorption der primären assoziierten Amidbanden. Bei festen Amiden sind beide Frequenzen beträchtlich erniedrigt und außerdem tritt eine Verbreiterung der Absorptionsbanden auf.

Die Valenzschwingungen der freien NH-Gruppe erscheint normalerweise bei 3500 und 3400 cm^{-1}. Die Absorptionen erscheinen nach Richards und Thompson (42) aber bei assoziierten

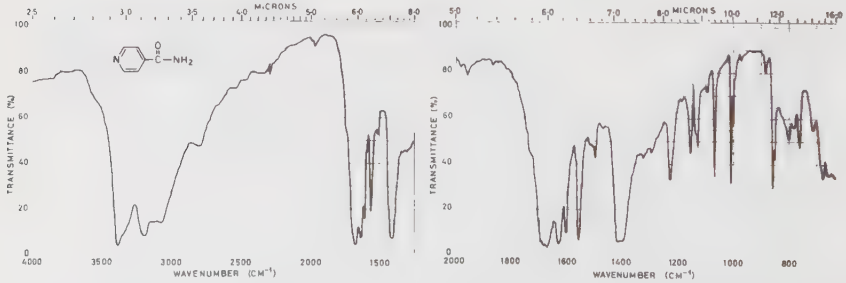


Abb.13 IR-Spektrum von INA 1,5 mg in KBr.

Verbindungen nahe bei 3350 und 3180 cm^{-1}. Bei INA werden die Absorptionen bei 3380 und 3190 cm^{-1} gemessen. INA liegt also als assoziierte Substanz vor. Die C-H-Schwingungen aus dem aromatischen Ring liegen bei 3060 cm^{-1}. Die Abb.13 gibt das Spektrum von INA wieder.

3.) Spektrum von INH

Die Amid-I-Bande erscheint von INH bei 1675 cm^{-1} und steht damit in Übereinstimmung mit freien sekundären Amidgruppierungen, die bei 1680 cm^{-1} auftreten. Die NH-Deformationsschwingung erscheint bei 1560 cm^{-1}. Damit liegt die Amid-I-

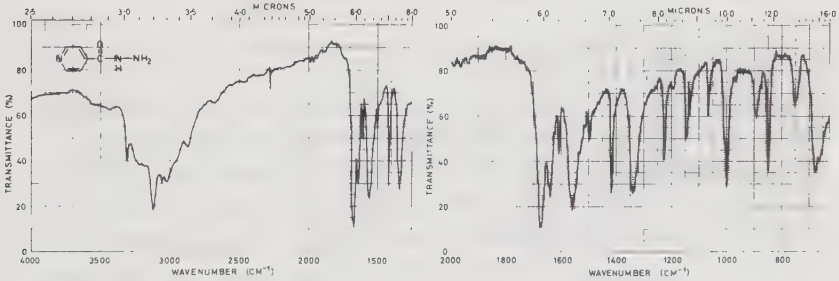


Abb.14 IR-Spektrum von INH 1,5 mg in KBr.

wie auch die Amid-II-Bande in Übereinstimmung mit D.Prevorŝek (43). Die ν C-H aromatisch absorbieren bei 3060 cm^{-1}. Die NH-Valenzschwingungen werden an den Banden 3120 und 3310 cm^{-1} erkannt. Die Abb.14 zeigt das IR-Spektrum von INH.

4.) Spektrum von DINH

Das Spektrum von DINH läßt ν CO für sekundäre Amidgruppen sehr breit von 1660-1700 cm^{-1} erscheinen. Die Erklärung liegt in der Resonanzstruktur der Amidgruppe. Die am Stickstoff nicht oder nur einfach substituierten Amide enthalten neben der gerade erwähnten noch eine weitere starke Bande, die Amid-II-Bande für sekundäre Amide, für DINH bei 1540-1560 cm^{-1}.

Die NH-Valenzschwingung für sekundäre Gruppierungen erscheint ebenfalls als assoziierte Bande bei 3200 und als freie Bande bei 3440 cm^{-1}.

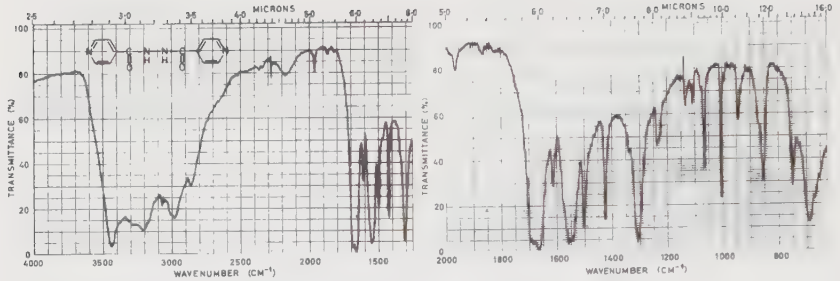


Abb.15 IR-Spektrum von DINH 1,5 mg in KBr.

Die Abb. 15 gibt das Spektrum von DINH wieder.

5.) Spektrum von IIHON

Alexandrou und Vasilikiotis (44) interpretierten die Amid-I-Bande wie auch die Amid-II-Bande anhand der Verbindung Isonicotinoylbenzalhydrazon. Die Amid-I-Bande von IIHON liegt damit in Übereinstimmung mit den beiden Autoren bei 1695 cm^{-1}. Die Amid-II-Bande ist nicht so charakteristisch wie die Absorption der Carbonylbande und liegt normalerweise bei 1525-1560 cm^{-1}, bei IIHON befindet sie sich bei 1575 cm^{-1}. Die NH-Valenzschwingung erscheint wie die Amid-II-Bande von DINH assoziiert bei 3200 cm^{-1}. Die Verlagerung zur höheren

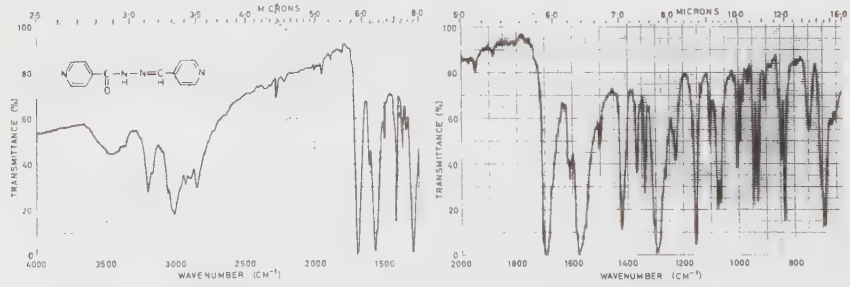


Abb.16 IR-Spektrum von IIHON 1,5 mg in KBr.

Frequenz für die Amid-I-Bande erklärten Alexandrou und Vasilikiotis damit, daß der aromatische Kern als ein Elektronenakzeptor wirkt. Diese Annahme steht in Übereinstimmung

mit Hinman's (45) Vermutung, daß die Hydrazongruppe (>C=N-N<) als Elektronendonator fungiert, wie es die Hydrazone von aromatischen Aldehyden im UV-Spektrum zeigen. ν C-H Aldehyd erscheint bei 2850 cm^{-1}.

Das Spektrum von IIHON wird durch die Abb.16 wiedergegeben.

G. Oxydation von INH mit Hämin

Angeregt durch die Arbeit von Albert und Rees (9) über die Zerstörung von INH in Gegenwart von Hämin, sollte untersucht werden, ob hierbei die gleichen Oxydationsprodukte entstehen wie bei der Oxydation mit Peroxydase-H_2O_2. Beide Autoren hatten DINH und INS nachweisen können. Auch bei der Aufklärung des Chemismus der INH-Spaltung durch Hämin (6) hat Krüger-Thiemer die Umsetzungen im alkalischen Milieu mit Hämin vorgenommen.

Das gereinigte Hämin nach Fischer (46) zeigt als Pyridin-Hämochromogen-Komplex (47) die höchste Intensität bei 557 nm (Maximum der Lage der α-Bande des Pyridin-Hämochromogen-Komplexes). $\varepsilon = 2{,}84 \cdot 10^7$ cm^2/Mol.

1.) Oxydation von INH mit Hämin und H_2O_2

Der Reaktionsansatz wurde folgendermaßen zusammengestellt:

1 ml 0,04 m Häminlösung
1 ml 0,1 m INH-Lösg.
1 ml Pufferlösg. pH 4-9
1 ml 0,0001 m H_2O_2.

Nach 3 Stunden Reaktionszeit wurde dünnschichtchromatographisch sehr wenig INA, IIHON und INS sowie das Ausgangsprodukt INH identifiziert. Ohne H_2O_2-Zugabe wurde der gleiche Effekt erzielt. Die Reaktionszeit wurde auf 123 Stunden ausgedehnt und hierbei zeigte sich eine geringe Verstärkung der Umsetzung.

Bei dem nächsten Ansatz wurde 1 ml 0,01 m H_2O_2 benutzt. Eine stärkere Oxydation von INH konnte festgestellt werden, zusätzlich wurde nunmehr DINH als Oxydationsprodukt nachgewiesen.

Auch war es wieder ersichtlich, daß IIHON stärker im sauren und DINH im alkalischen Bereich zunahm.

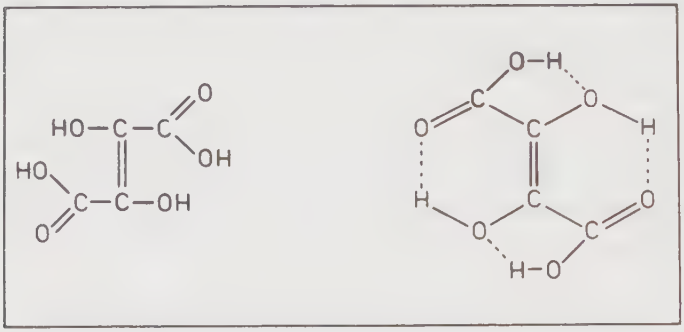
Eine weitere Steigerung der H_2O_2-Zugabe um das Zehnfache hat wieder eine Oxydation geliefert, wie es die Reaktionsansätze mit POD gezeigt haben. Es wurden die Produkte INS, INA, DINH und IIHON sowie das Ausgangsprodukt INH gefunden.

Ein weiterer Ansatz wurde nach Krüger-Thiemer (6) durchgeführt. Der Ansatz wurde in n/20 NaOH, INH (50 µg/ml) und Hämin (2 µg/ml) ausgeführt und ergab die Oxydationsprodukte INS, INA, DINH, IIHON. INH ergab unter gleichen Versuchsbedingungen mit n/20 NaOH keine Reaktion.

H. Oxydationsansätze unter Zusatz von Dihydroxyfumarsäure

1.) Eigenschaften von Dihydroxyfumarsäure

Die Dihydroxyfumarsäure (DHF) leitet sich von der Fumarsäure ab:



Schmelzpunkt: 150°C MG: 148,08

Einige Peroxydasen sind in der Lage, die aerobe Oxydation der DHF zu katalysieren. Hierbei wird aber immer Sauerstoff benötigt. DHF spricht sehr leicht auf Autoxydation an, die durch Metalle katalysiert wird. Manganionen sind z.B. gute Katalysatoren bei dem POD-DHF-System:

$$O_2 + DHF \xrightarrow{POD + Mn^{2+}} H_2O_2 + \text{Diketobernsteinsäure}$$

$$H_2O_2 + DHF \xrightarrow{POD + Mn^{2+}} 2H_2O + \text{Diketobernsteinsäure}$$

Mason (48) hat festgestellt, daß hierbei nicht Diketobernsteinsäure als Endprodukt entsteht, sondern durch Decarboxylierung Glyoxal.

Mason, Onopyrenko und Buhler (49) haben gefunden, daß POD in Gegenwart von DHF/O_2 Hydroxylierungsreaktionen katalysiert. Erste Untersuchungen dieser Reaktion haben sie mit Phenylalanin, Tyrosin, p-Kresol, Benzoe- und Salicylsäure durchgeführt.

DHF bleibt bei der DC-Untersuchung am Startfleck liegen und

läßt sich mit 1%iger $Na_3(Fe(CN)_5NH_3)$ orange anfärben.

2.) Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Umsetzungen von INH im POD-DHF-H_2O_2-System

a.) Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Untersuchungen erstreckten sich über den pH-Bereich 4-9. Folgender Ansatz wurde untersucht:

1 ml Puffer pH 4-9
0,5 ml INH-Lösg. (3,3 mg INH, $2,5 \cdot 10^{-5}$ Mol)
1,0 ml DHF-Lösg. (1,55 mg DHF, ca. 10^{-5} Mol)
0,5 ml POD-Lösg. (1,56 mg POD)
1 ml m/10 H_2O_2
0,5 ml bidest. Wasser.

Hierbei wurde ein neues Umsetzungsprodukt erhalten, dessen Bildung vom pH-Wert unabhängig erschien. Die schon bekannten Oxydationsprodukte traten wieder auf.

b.) Abhängigkeit von der H_2O_2-Konzentration

In dieser Versuchsreihe wurde die DHF- und POD-Zugabe konstant gehalten. Für jeden pH von 4-9 wurde die H_2O_2-Zugabe folgendermaßen gesteigert: 0,3, 0,6, 0,9, 1,5 ml m/100 H_2O_2, 0,3. 0,6, 0,9, 1,5 ml m/10 H_2O_2, Bidest. Wasser zu 4,5 ml Gesamtvolumen. Ansonsten wurde obiger Ansatz übernommen. Für das neue Umsetzungsprodukt, das von jetzt an die Bezeichnung Sy trägt, hatte die H_2O_2-Zunahme wenig Bedeutung, dagegen konnte INA- und IIHON-Bildung in allen pH-Bereichen leicht gesteigert werden.

c.) Abhängigkeit von der POD-Konzentration

Für jeden pH von 4 bis 9 wurde, wie aus dem nachfolgenden Ansatz zu ersehen ist, die POD-Konzentration geändert. Alle Ansätze wurden, wie auch schon die vorhergehenden Versuchsreihen, 4 Stunden der Reaktion ausgesetzt.

1,0 ml Puffer pH 4-9
0,5 ml INH-Lösg. ($1,5 \cdot 10^{-5}$ Mol, 2,05 mg INH)
1,0 ml DHF-Lösg. (1,55 mg DHF, ca. 10^{-5} Mol)
1,0 ml m/10 H_2O_2
0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 ml POD-Lösg. (3,12 mg POD/ml)
Bidest. Wasser zu 8 ml Gesamtvolumen.

In allen pH-Bereichen hat sich durch die POD-Zugabe keine bedeutend höhere Umsetzung von INH erzielen lassen, wie es aus der DC abgelesen werden konnte. Lediglich eine Steigerung der INA-Bildung konnte vermerkt werden.

d.) Abhängigkeit von der DHF-Zugabe

Zu dieser Versuchsreihe wurde folgender Ansatz hergestellt:

1,0 ml Puffer pH 4-9
0,5 ml INH-Lösg. (2,05 mg INH, $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ Mol)
1,0 ml m/10 H_2O_2
0,5 ml POD-Lösg. (1,56 mg POD)
1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0 ml DHF-Lösg. (1,54 mg DHF/ml)
Bidest. Wasser zu 7 ml Reaktionsgemisch.

Bei dieser Versuchsreihe fiel es auf, daß mit zunehmender DHF-Konzentration die Substanz Sy verstärkt auftrat.

Daraufhin wurde ein Ansatz nur mit INH und DHF-Lösg. durchgeführt. Hierbei gab es aber nur nach längerem Stehen an der Luft eine schwache Umsetzung. Daraus wurde geschlossen, daß bei der Umsetzung H_2O_2 zugegen sein muß. Aus dieser Überlegung wurde folgender Ansatz zusammengestellt:

1 ml INH-Lösg. (3,3 mg INH, $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ Mol)
1 ml DHF-Lösg. (6,6 mg DHF, $4{,}6 \cdot 10^{-5}$ Mol)
1 ml m/10 H_2O_2
1 ml Puffer pH 4-9.

Nach 3 Stunden Reaktionszeit trat die Substanz Sy unabhängig vom pH-Bereich gleichmäßig auf. Nach 20 Stunden hatte sich noch mehr INH umgesetzt. Sehr geringfügig traten die schon vorher erwähnten Oxydationsprodukte INA, INS, DINH, IIHON auf.

Ein Ansatz aus INH, POD, DHF und hindurchgeleitetem Luftsauerstoff zeigte nur im geringen Maße die Resultate, die vorher erzielt wurden.

Bei längerem Stehenlassen eines Reaktionsansatzes ist ein Rückstand angefallen, der abfiltriert und dünnschichtchromatographisch untersucht, den gleichen Rf-Wert und die gleiche Farbreaktion mit dem Detektionsmittel ergab, wie Sy in den Oxydationsansätzen.

3.) Isolierung der Substanz Sy.

Da aus vorhergehenden Tests herausgefunden wurde, daß zur Bildung des neuen Umsetzungsproduktes Sy weder die pH-Bereiche noch die POD-Konzentration von ausschlaggebender Bedeutung waren, wurden für den Ansatz zur Isolierung von Sy der Puffer und die POD fortgelassen.

500 ml DHF-Lösg. (1,0 g DHF, $0{,}6 \cdot 10^{-2}$ Mol)
200 ml INH-Lösg. (1,0 g INH, $0{,}6 \cdot 10^{-2}$ Mol)
200 ml m/10 H_2O_2 (4,5 oxval bezogen auf INH).

Der gebildete Rückstand wurde abfiltriert und aus Eisessig umkristallisiert. Es wurden hellgelbe, rhombische Kristalle erhalten, die auf DC die gleichen Rf-Werte wie der Fleck von Sy aus der Versuchsreihe ergaben. Ebenfalls ergab sie die gleiche Farbreaktion mit dem Detektionsmittel, so daß feststand, daß die Substanz Sy isoliert worden ist.

4.) Untersuchungen auf die chemischen Gruppen im Molekül

Da die Substanz Sy ungünstige Lösungseigenschaften in den meisten organischen Lösungsmitteln zeigte, wurde sie deshalb acetyliert.

Schmelzpunkt von Sy ca. 360°C unter Zersetzung
Schmelzpunkt von acetyl. Sy 243°C.

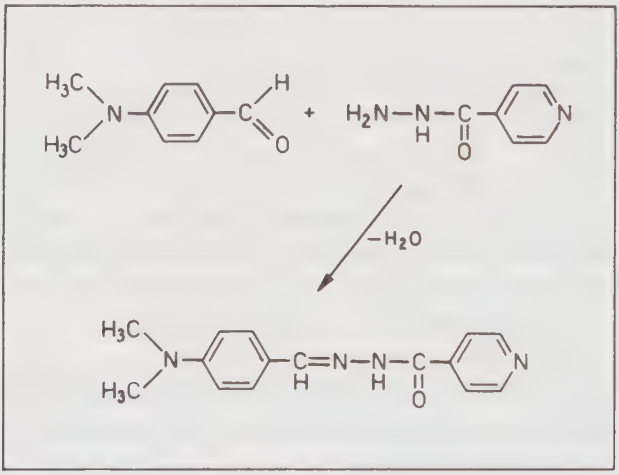
Die Untersuchungen wurden auf INH, INS, DINH, IIHON, INA und der Substanz Sy wie der acetylierten Substanz Sy ausgedehnt, um bessere Vergleiche und Aussagen treffen zu können.

Die sauren und alkalischen Lösungsversuche (10%ige NH_4OH, 10%ige NaOH, 10%ige KOH, 20%ige HCl, 30%ige H_2SO_4, 10%ige HNO_3) ergaben, daß im sauren Lösungsmittel die Substanzen alle, wenn auch z.T. unter Erwärmen sich lösten. In den Laugen war die acetyl. Sy trotz Erwärmen unlöslich, während sich die anderen mit gelber Färbung auflösten. Die Gelbfärbung ist auf eine Protonenverschiebung an den Hydrazidstickstoffen zurückzuführen (50), die bei der acetyl. Sy fortfällt, die nur im Sauren löslich ist.

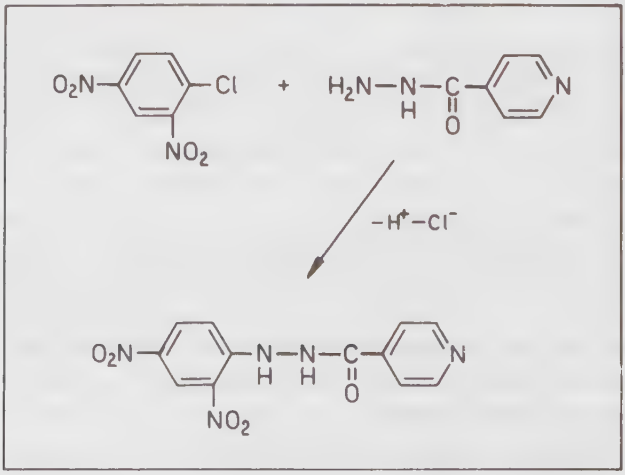
Mit den folgenden Reagenzien wurde nun auf charakteristische chemische Gruppen geprüft, um die Strukturformel zu ermitteln.

a.) Auf primäre freie Amine wurde mit der Isonitrilreaktion geprüft. Ergebnis überall negativ.

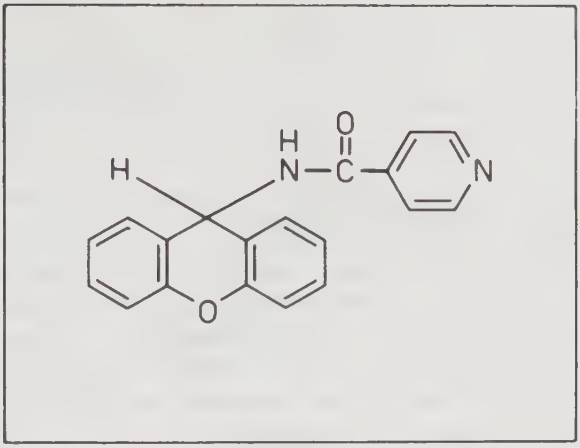
b.) Auf freie Amine und Hydrazine:
2%ige p-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösg. ergab nur bei INH eine positive Reaktion.



2,4 Dinitrochlorbenzol (51) auf Hydrazin ergab nur bei INH eine positive Reaktion.



c.) Reaktion auf Säureamid-Struktur durch Xanthydrol-Eisessig-Lösung (52): Nur bei INA war eine Bildung von feinen Nadeln festzustellen.



d.) Reaktion auf Hydroxyl-Gruppen mit Folin-Ciocalteus-Reagens: Hierbei zeigten INA und INS wie auch die acetylierte Substanz Sy keine Reaktion. INH und DINH ergaben eine Blaufärbung, IIHON und Sy verursachten eine grünblaue Färbung.

e.) Reaktion mit Nitroprussidnatrium auf Ketogruppen ergab bei allen Substanzen eine ähnliche Reaktion, die Verfärbung verblaßte sehr schnell.
Mit 2,4 Dinitrophenylhydrazin auf Ketogruppen ergab bei INH, INA und INS keine Reaktion, bei allen anderen Substanzen wurde eine Hydrazonbildung festgestellt.

Das Ergebnis aus diesen Untersuchungen lief darauf hinaus, daß die Substanz Sy keine freie $-NH_2$, $-CONHNH_2$, $-CONH_2$-Gruppe enthielt. Ihre Ähnlichkeit mit IIHON bei der Folin-Ciocalteus-Reaktion und bei der Detektion auf dem DC mit dem Ferroat-Sprühtest läßt vermuten, daß Hydrazonstruktur im Molekül vorliegt. Ebenso ist eine Ketogruppierung ähnlich wie bei DINH und IIHON vorhanden.

5.) Molekulargewichtsbestimmung und Aufstellung der Summenformel

Die Bestimmung des Molekulargewichts wurde mit Hilfe eines Dampfdruckosmometers durchgeführt. Aus lösungstechnischen Gründen wurde die acetylierte Substanz Sy benutzt. Nähere Angaben für die Berechnung werden in dem Kapitel "Isolierung

der Substanzen Sx und Sy" angegeben.

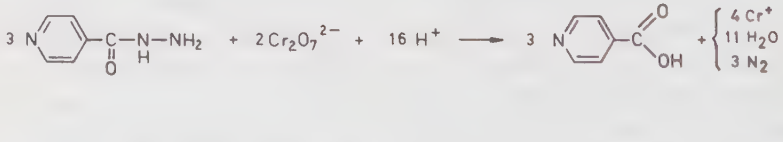
Der Mittelwert der Molekulargewichtsbestimmung betrug 372. Aus der Elementaranalyse wurden folgende Werte gemessen:

C: 57,34%, H: 4,36%, N: 22,38%.

Daraus ergab sich eine Summenformel für acetyl. Sy von $C_{18}H_{16}N_6O_4$, Molekulargewicht: 380,4.
Bei der Acetylgruppenbestimmung wurde folgender Wert gefunden: $-OCCH_3$: 22,44%. Die Berechnung ergab, daß die acetyl. Sy 2 Acetylgruppen enthielt und damit berechnet sich das Molekulargewicht von Sy auf 296,3, die Summenformel auf $C_{14}H_{12}N_6O_2$. Die genaue Zahl der Wasserstoffatome muß jedoch zunächst als unsicher betrachtet werden.

6.) Oxydimetrische Titration mit Kaliumdichromat

Nach dem Vorbild der quantitativen Bestimmung von INH (53) mit Hilfe von n/10 $K_2Cr_2O_7$ wurden folgende Substanzen bestimmt: Isonicotinal, INH, DINH, IIHON, Sy. INS und INA ließen sich nicht nach der chromatometrischen Methode titrieren. Für INH kann man folgende Reaktionsgleichung formulieren:



Nach der stöchiometrischen Berechnung waren 1 ml n/10 $K_2Cr_2O_7$ folgenden Mengen der Substanzen äquivalent:

1 ml n/10 $K_2Cr_2O_7$ ≙ 3,429 mg INH
6,056 mg DINH
3,769 mg IIHON
5,355 mg Isonicotinal
2,469 mg Sy

Das Isonicotinal wird bei der Titration zu Isonicotinsäure oxydiert. Alle sonstigen Substanzen wurden bei der Titration zu Isonicotinsäure und zu Stickstoff oxydiert.

In der folgenden Tabelle 9 ist der Verbrauch an Kaliumdichromat und seinen Oxydationsäquivalenten angegeben.

Substanz 10^{-3} Mol	Verbrauch an Kaliumdichromat	
	ml n/10	val
INH	39,5 ml	$4 \cdot 10^{-3}$
DINH	39,9 ml	$4 \cdot 10^{-3}$
Isonicotinal	19,0 ml	$2 \cdot 10^{-3}$
IIHON	60,2 ml	$6 \cdot 10^{-3}$
Sy	119,2 ml	$12 \cdot 10^{-3}$

Tab.9 Verbrauch an Kaliumdichromat für 1 Mol der einzelnen Substanzen

Die oxydimetrische Titration hat bewiesen, daß für ein N-Atom der Hydrazid- bzw. der Hydrazongruppe im Molekül 2 val $K_2Cr_2O_7$ verbraucht wurden, die gleiche Menge an Kaliumdichromat trifft auch für die Oxydation von Isonicotinal zu Isonicotinsäure, also von der Aldehyd- zur Säuregruppierung zu. Die Titration von Isonicotinal war wegen der leichten Oxydierbarkeit der Substanz zur Säure an der Luft schwierig, deshalb weicht der Wert auch bei der Titration etwas ab.

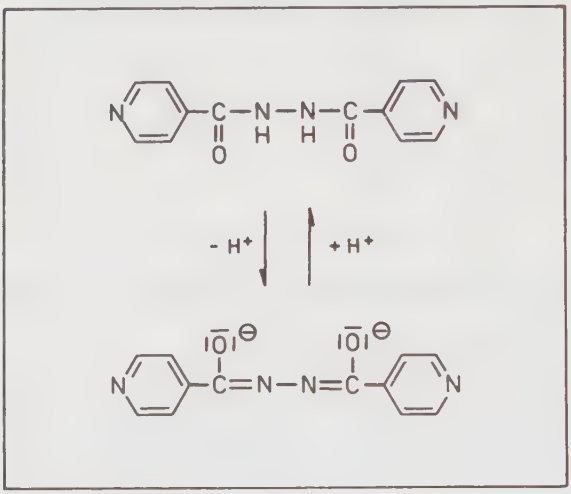
Aus diesem Versuch konnte geschlossen werden, daß die Substanz Sy wahrscheinlich 4 N-Atome außer denen aus dem Pyridinring und 2 Aldehydgruppen enthielt.

7.) Acidimetrische Titration

Wie schon vorher erwähnt, wurde bei der Lösung im sauren wie im alkalischen Medium eine Farbveränderung der Lösung von farblos nach gelb festgestellt. Diese Farbveränderung wurde als eine Protonenverschiebung in Form einer Keto-Enol-Tautomerie gedeutet, wie sie z.B. bei DINH auftreten kann (54). Dieses macht sich bemerkbar, wenn man eine UV-Messung von DINH in Wasser vornimmt (λmax 266 nm) und

in n/20 NaOH (λ max 325 nm) (6).

Dieses Proton sollte mit Hilfe einer acidimetrischen Titration bestimmt werden. Diese Möglichkeit ist ausgeschieden, weil die Substanz bei pH 2,9 ausgefallen ist.



8.) Oxydation von INA, DINH, IIHON mit DHF-H_2O_2

Es wurde das gleiche Ansatzschema von der Oxydation von INH mit DHF-H_2O_2 auf die anderen Umsetzungsprodukte übertragen, um zu untersuchen, ob ebenfalls neue Umsetzungsprodukte entstehen. Die Versuche zeigten keine Ähnlichkeit mit dem Ansatz von INH.

9.) Spektren der Substanzen Sy und acetylierte Sy

a.) UV-Spektren

Die Substanz Sy wurde in Dimethylformamid gelöst. Die Lösung enthielt $3{,}42 \cdot 10^{-5}$ Mol/L. Die Kurve besaß ein Maximum bei $\lambda = 322$ nm, $\varepsilon = 1{,}61 \cdot 10^{4}$ (L/Mol·cm), $E^{10^{-4}}_{1cm}$ 1,61. Ein Minimum erschien bei $\lambda = 377$ nm, eine schwache Kurvenerhebung zeigte sich bei $\lambda = 440$ nm.

Die acetylierte Substanz Sy ist in Chloroform gelöst worden. Die Lösung enthielt $3{,}42 \cdot 10^{-5}$ Mol/L. Das Maximum der Kurve lag hypsochrom verändert bei λ = 311 nm, $\epsilon = 1{,}61 \cdot 10^{4}$ (L/Mol·cm), $E^{10^{-4}}_{1cm} = 1{,}61$. Das schwach ausgebildete Maximum bei λ = 440 nm von Sy ist bei der acetylierten Substanz Sy verschwunden.

Beide UV-Spektren sind in der Abb. 17 wiedergegeben.

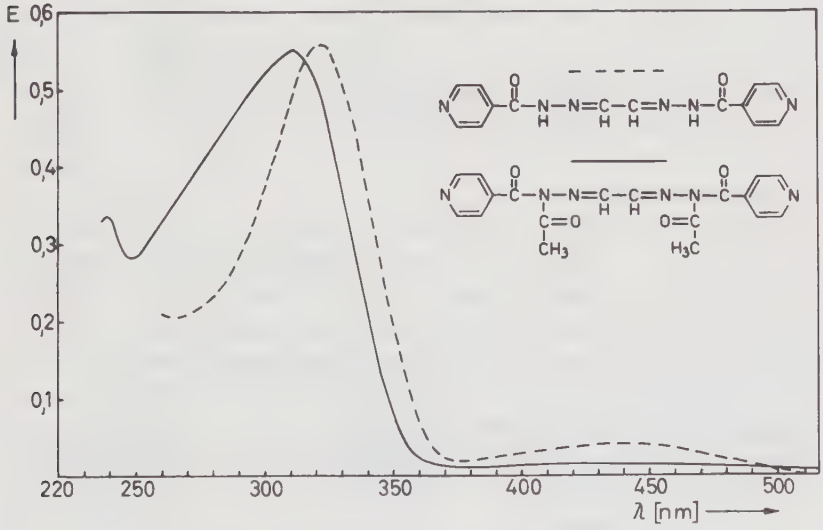


Abb.17 UV-Spektren von Sy und von acetyliertem Sy.

b.) IR-Spektren von Sy und von acetyliertem Sy

Die wichtigsten Schwingungsbereiche einzelner, charakteristischer Molekülgruppen von Sy und acetylierter Sy sind in der Tab.10 zusammengefaßt.

Schwingungsbereiche cm^{-1}	Sy	acet. Sy
ν CO (Amid-I-Bande)	1665	1680
δ NH (Amid-II-Bande)	1550	----
ν NH	3180-3220	----
>C=C< aromatisch	1500, 1590,1605	1505, 1560, 1605
C-H aromatisch	3050	3050
ν C-H Aldehyd	2830	2840
δ C-H aus CH_3 ν C-H aus CH_3	----	1370, 2990, 2930

Tab.10 Charakteristische IR-Banden von Sy und acetyliert. Sy

1.) Spektrum von Sy

Sy zeigt wie alle anderen Substanzen eine Amid-I-Bande bei 1665 cm^{-1} und liegt damit der Amid-I-Bande von INH am nächsten. Die Amid-II-Bande liegt wie bei den Substanzen DINH und IIHON bei 1550 cm^{-1}. Die Valenzschwingung NH tritt ebenfalls wie bei dem Hydrazon IIHON sehr charakteristisch bei 3200 cm^{-1} hervor. Diese Bande fehlt bei INH vollständig, bei DINH tritt sie nur sehr schwach hervor. Eine Bande bei 2830 cm^{-1} deutet auf eine Aldehyd-Gruppierung im Molekül hin. Bei IIHON wird diese Bande bei 2850 cm^{-1} als eine Aldehydkonfiguration angesehen.

Das Spektrum wird in Abb.18 wiedergegeben.

2.) Spektrum von acetylierter Sy

Die acetylierte Substanz weist gegenüber Sy einen Unterschied in der Carbonylschwingung auf, die bei 1680 cm^{-1} liegt, die Amid-II-Bande ist verschwunden und es ist nur noch die scharfe Bande von >C=C< aromatisch zu erkennen. Ebenso ist die NH-Valenzschwingung bei 3200 cm^{-1} nicht mehr vorhanden. Die Absorption der Aldehydgruppe ist nur noch andeutungsweise bei 2840 cm^{-1} zu erkennen. Die Deformationsschwingung C-H aus CH_3 erscheint bei 1370 cm^{-1}, die Valenzschwingung C-H aus der Acetylgruppe erscheint asymmetrisch bei 2990 cm^{-1} und symmetrisch bei 2930 cm^{-1}. Da keine Esterbande, die

üblicherweise bei 1730 cm^{-1} auftritt, vorhanden ist, und weil die NH-Absorption stark zurückgegangen ist, wird hieraus geschlossen, daß es sich um eine N-Acetylierung handelt. Die Abb. 19 gibt das IR-Spektrum von acetyliertem Sy wieder.

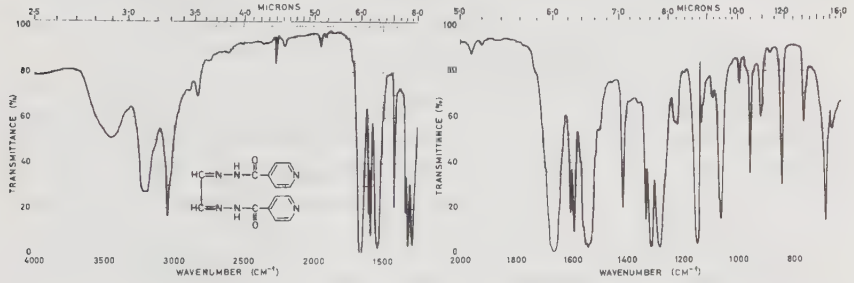


Abb. 18 IR-Spektrum von Sy 1,0 mg in KBr.

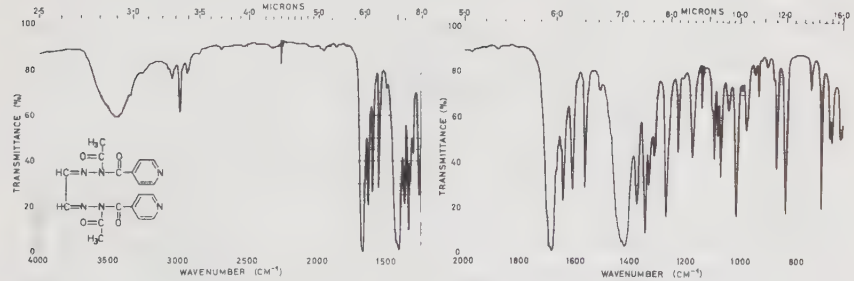


Abb. 19 IR-Spektrum von acetyl. Sy 1,0 mg in KBr.

c.) NMR-Spektrum von acetylierter Sy

Das Kernresonanzspektrum wurde mit dem Spektrometer Varian A 60 aufgenommen. x)

Die Signale der aromatischen Protonen liegen zwischen 8,48

---

x) Der Firma Schering AG, Berlin, und besonders den Herren Dr. Neudert, Dr. Schulz und Brunn wird für die Messung und Hilfe bei der Interpretation des Spektrums aufrichtig gedankt.

und 9,13 ppm. Die Ringprotonen erscheinen als Dubletts, für H_2 und H_6 bei 9,13 und 9,0 ppm, für H_3 und H_5 bei 8,63 und 8,48 ppm. Da es sich hier um eine o-Kopplung handelt, ergibt sich eine Kopplungskonstante J = 6,3 Hz. Die Integration ergibt für jedes Dublett 2 Protonen. Es ist also keine Substitution am Pyridinring eingetreten, eine p-Substitution war durch die Ausgangssubstanz vorgegeben.

Ein Singulett bei δ = 7,13 ppm weist auf zwei olefinische Protonen hin, es handelt sich um die Aldehydprotonen des Glyoxals (48). Die beiden Acetylgruppen bei 2,62 ppm sind durch 6 Protonen aus der aliphatischen Methylgruppe bewiesen.

Das Spektrum hat eine weitere wichtige Aussage in der Strukturaufklärung der Substanz Sy geleistet. Das Kernresonanzspektrum ist in der Abb. 20 wiedergegeben.

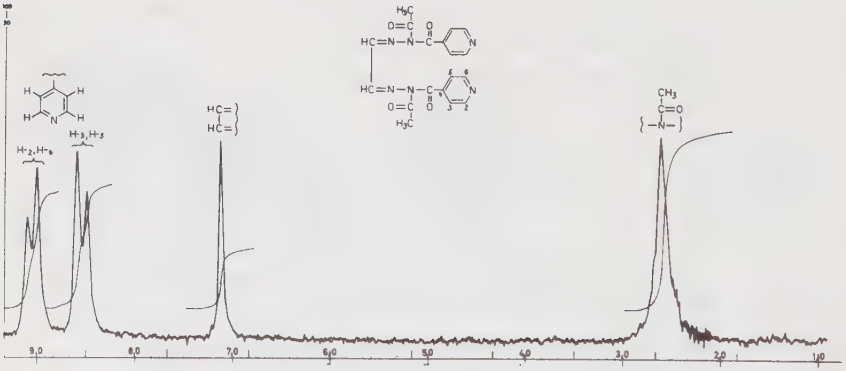


Abb. 20 Kernresonanzspektrum von acetylierter Sy in CF_3COOH

10.) Zusammenfassung der ermittelten Strukturelemente

Durch die Untersuchungen ist es gelungen, viele bedeutende Aussagen über die Struktur von Sy zu treffen.

Aus den Untersuchungen über die chemischen Gruppen im Molekül wurde Hydrazonstruktur und Carbonylgruppierung im Molekül ähnlich wie bei IIHON und DINH gefunden. Diese Tatsache wird noch unterstützt durch die gleiche Farbreaktion von Sy mit

IIHON mittels des Ferroatsprühtestes.

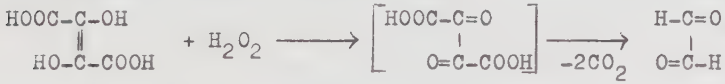
Aus der Summenformel $C_{14}H_{12}N_6O_2$ ist vermutet worden, daß 4 Stickstoffatome als Hydrazid- bzw. Hydrazonstruktur und 2 Aldehydgruppen vorhanden sein müssen. Diese Vermutung wurde durch die Kaliumdichromat-Titration bestätigt.

Aus dem IR-Spektrum wurde eine N-Acetylierung abgelesen, die Acetylgruppenbestimmung und das NMR-Spektrum der acetyl. Sy wiesen 2 Acetylgruppen nach. Zwei substituierbare Protonen mußten also an zwei Stickstoffen gebunden sein, damit eine N-Acetylierung stattfinden konnte.

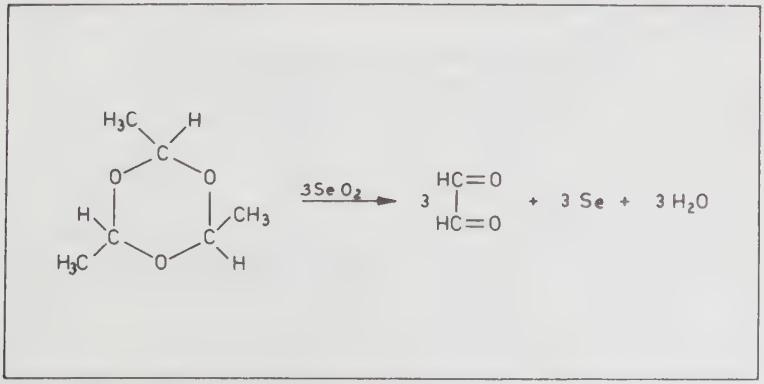
Aus dem NMR-Spektrum der acetyl. Sy konnte noch durch 2 Protonen bei δ=7,13 ppm auf eine olefinische Gruppe im Molekül geschlossen werden.

11.) Strukturaufklärung der Substanz Sy durch Synthese

Die Dihydroxyfumarsäure kann durch den Einfluß von Enzymen oxydativ decarboxyliert werden, und es entsteht als Endprodukt Glyoxal (48). Diese Reaktion läuft über das unbeständige Zwischenprodukt Diketobernsteinsäure.

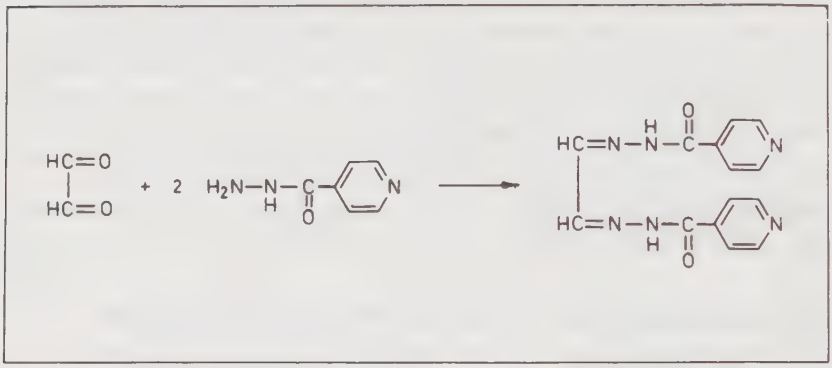


Mit dem Glyoxal haben sich dann 2 Moleküle INH in Form einer Schiffschen Base umgesetzt. Nach der Synthese von Barry und Mitchell (50) wurde ein Diisonicotinoylhydrazon des Glyoxals hergestellt.



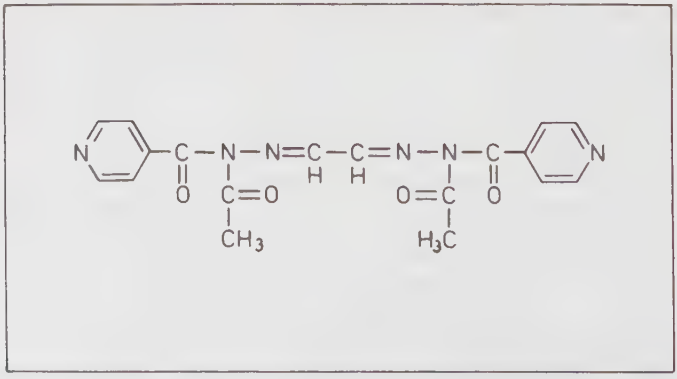
Das Glyoxal wurde aus Paraldehyd durch Oxydation mit Selendioxid dargestellt, hierbei bildet sich als Zwischenprodukt erst Acetaldehyd, der dann zu Glyoxal oxydiert wird.

Das monomere Glyoxal, das man dadurch erhält, indem man das polymere Gemisch auf 51°C erwärmt, wurde mit INH umgesetzt.



Die Übereinstimmung der synthetisch dargestellten Substanz mit Sy wurde durch IR-Spektrum (Abb.21), UV-Spektrum, Schmelzpunkt (360°C unter Zersetzung) und Mischschmelzpunkt, gleichen Rf-Wert sowie durch die gleiche Farbreaktion mit dem Ferroat-Sprühmittel nachgewiesen.

Die acetylierte Sy ist folgendes Acetylderivat:



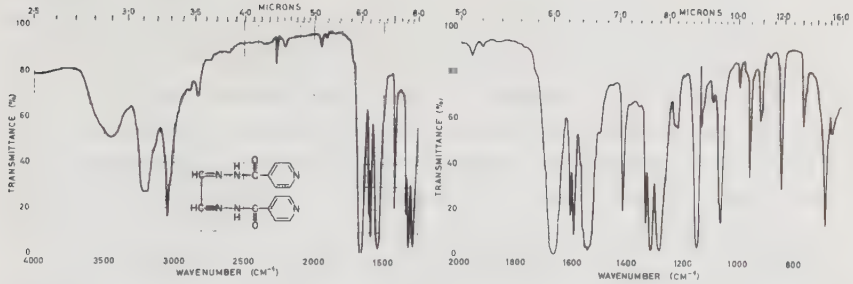
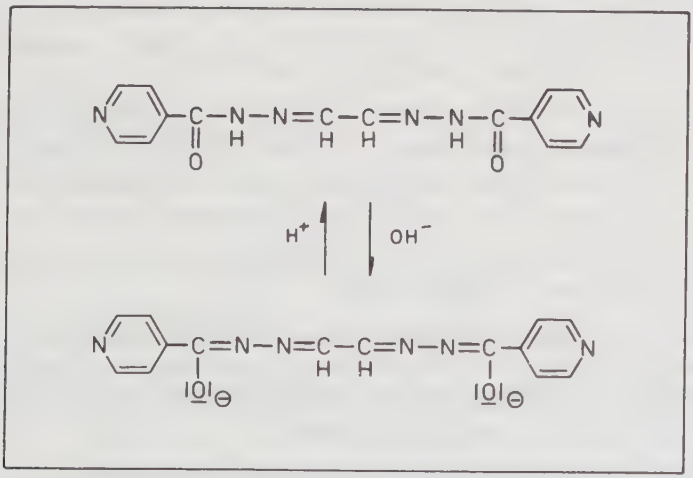


Abb. 21 IR-Spektrum von Glyoxal-Diisonicotinoylhydrazon 1,0 mg in KBr.

Barry und Mitchell (50) erklären die Farbveränderung der Substanz im alkalischen Milieu nach gelb und in saurem Milieu nach schwach gelb mit einer Keto-Enol-Tautomerie.



I. Oxydation von INH mit POD in Gegenwart von NADH und NADPH

Ähnlich wie DHF können auch NADH und NADPH als Kofaktoren bei der Hydroxylierung wirken. Es sollte geprüft werden, ob INH ein geeignetes Substrat hierfür ist. Dolin (55) fand heraus, daß zellfreie Extrakte von Salmonella faecalis NADH oxydierten. Ebenso hat Tanenbaum (56) gefunden, daß eine Peroxydase in Acetobacter peroxidans vorhanden ist, die die Oxydation des Kofaktors NADPH mit H_2O_2 durchführt. Das Oxydationspotential von NADPH liegt höher als das von NADH. Es sollte nun untersucht werden, wie sich INH im Oxydationsansatz von POD-H_2O_2-NADH (NADPH) verhält.

1.) Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Umsetzung von INH mit POD-H_2O_2-NADH

Folgender Ansatz wurde durchgeführt:

2 ml INH-Lösg., 11,6 mg (ca. $9 \cdot 10^{-5}$ Mol) in pH 7 Puffer
1 ml POD-Lösg., 1,84 mg POD
1 ml m/10 H_2O_2, 10^{-4} Mol
1,0 - 2,5 ml NADH-Lsg. (1,8/2,7/3,6/4,5 mg NADH = $3\text{-}6 \cdot 10^{-6}$ Mol)
Bidestilliertes Wasser auf 7,5 ml Gesamtvolumen.

Nach 2stündiger Reaktionsdauer wurden jeweils 30 µg bezogen auf INH-Einwaage aufgetragen. Es konnte keine Umsetzung festgestellt werden. NADH bleibt am Startfleck zurück und färbt sich nach längerer Zeit an der Luft rosa an.

Die Reaktionszeit wurde auf 48 Stunden verlängert. Es entstand hierbei wenig INS und DINH.

Bei dem folgenden Ansatz wurde die POD-Menge verdoppelt. Der Ansatz wurde sonst unverändert übernommen. Das Ergebnis besagte, daß INS, DINH, INA und schwach IIHON entstanden sind, also kein weiteres Oxydationsprodukt.

Bei dem nächsten Ansatz sind die Oxydationsäquivalente von H_2O_2 und die NADH-Zugabe verzehnfacht worden.

2 ml INH-Lösg. 11,6 mg INH ($9 \cdot 10^{-5}$ Mol) in pH 7 Puffer
1 ml POD-Lösg. 4,0 mg POD
2 ml m/10 H_2O_2, $2 \cdot 10^{-4}$ Mol
1,0 - 2,5 ml NADH-Lösg. (18,4/27,6/35,8/46,0 mg NADH = $3 - 6 \cdot 10^{-5}$ Mol)
Bidestilliertes Wasser auf 7,5 ml Gesamtvolumen.

Die Reaktionszeit nach 3 Stunden ergab lediglich die Bildung

von sehr wenig INS. Nach 24 Stunden Reaktionsdauer wurden die Oxydationsprodukte INS, wenig DINH und INA gefunden.

Die POD-Zugabe wurde erhöht:

2 ml INH-Lösg. 11,6 mg INH in pH 7 Puffer
3 ml POD-Lösg. 13,2 mg POD
2 ml NADH-Lösg. 36,7 mg NADH
3 ml m/10 H_2O_2

Die Reaktionszeit nach 3 Stunden wies eine schwache INS-Bildung auf. Nach 48 Stunden Reaktionszeit hat die Umsetzung von INH zugenommen und es konnten INS, DINH, IIHON, INA identifiziert werden.

Folgender Ansatz wurde variiert:

2 ml INH-Lösg. 10,0 mg INH (ohne Puffer-Zugabe)
2 ml POD-Lösg. 10,34 mg POD
4 ml NADH-Lösg. 20,7 mg NADH
2 ml m/10 H_2O_2

Der pH des Reaktionsansatzes betrug ca. 6.

Bei diesem Ansatz wurde

a) ohne NADH mit POD gearbeitet
b) mit NADH ohne POD " "
c) mit NADH und mit POD" "

Die Reaktionsmenge des Ansatzes wurde jeweils mit bidestilliertem Wasser ergänzt.

Nach 3 Stunden Reaktionszeit wurde folgendes Ergebnis erzielt:

a) INS, DINH, IIHON, INA, INH
b) wenig INS und IIHON
c) INS

Nach 24 Stunden Reaktionsdauer ist keine weitere Oxydation von INH eingetreten.

Sämtliche DC-Untersuchungen wurden auch unter der UV-Lampe ausgewertet, sie ergaben aber ebenfalls keinen weiteren Hinweis auf eine stärkere Umsetzung von INH bzw. auf ein neuentstandenes Oxydationsprodukt.

Die Ansätze haben gezeigt, daß die Oxydation von INH durch POD-H_2O_2 in Gegenwart von NAD^+ vermindert wird. Während der Ansatz mit NADH und POD nur INS als Oxydationsprodukt nachweisen ließ, wurdenbei dem Ansatz ohne NADH mit POD die Reak-

tionsprodukte INS, DINH, IIHON, INA gefunden. Neue Verbindungen insbesondere Hydroxylierungsprodukte des INH traten nicht auf.

2.) Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Umsetzung von INH mit POD-H_2O_2-NADPH

Aus dem enzymatischen Reduktionsansatz von NADP zu NADPH (siehe experimenteller Teil) wurden folgende Ansätze durchgeführt:

a) 0,3 ml NADPH-Ansatz in pH 7,6 Puffer, 7,65 mg, 10^{-5} Mol
0,2 ml INH-Lösg. 1,4 mg, 10^{-5} Mol
0,2 ml POD-Lösg. 1,3 mg POD
0,2 ml m/10 H_2O_2, $2 \cdot 10^{-5}$ Mol
0,8 ml bidest. Wasser

b) Dieser Ansatz wurde in folgenden Punkten abgeändert:
0,6 ml NADPH-Ansatz, 15,3 mg, $2 \cdot 10^{-5}$ Mol
0,3 ml m/10 H_2O_2, $3 \cdot 10^{-5}$ Mol
0,4 ml bidest. Wasser

c) Dieser Ansatz wurde in folgenden Punkten weiter abgeändert:
0,9 ml NADPH-Ansatz, 23,0 mg, $3 \cdot 10^{-5}$ Mol
0,4 ml m/10 H_2O_2, $4 \cdot 10^{-5}$ Mol

Das Gesamtreaktionsgemisch betrug immer 1,7 ml.

Nach 3 Stunden Reaktionszeit zeigten die Ansätze b und c oberhalb von INH einen schwachen gelbangefärbten Fleck, der aber von NADPH herrührte, wie ein Vergleichschromatogramm es bestätigen konnte. Es wurden wieder 30 µg, bezogen auf INH-Einwaage, aufgetragen. Der Versuch wurde über 72 Stunden ausgedehnt und zeigte dann, daß die Intensität der INH-Flecke abnahm. Es konnte aber weder unter UV-Licht noch nach Detektion mit Natrium-penta-cyano-nitroso-ferroat ein zusätzlicher Fleck gefunden werden.

Als Vergleich wurden sämtliche Ausgangsstoffe für sich allein dünnschichtchromatographisch untersucht. Hierbei wurde folgendes festgestellt:

Der Triäthanolaminpuffer hinterläßt auf DC einen langen Schwanz, der nach der Detektion gelblich angefärbt aussah.

$MgCl_2$-Lösg. bleibt am Startfleck liegen.

G6P-Na_2-Lösg. [+)] bleibt am Startfleck liegen und verfärbt sich beim Ansprühen nicht.

G6P-DH-Suspension [++)] in 3,3 m $(NH_4)_2SO_4$-Lösg. blieb am Startfleck liegen und hinterließ nur einen Salzfleck.

NADP-Lösg. bleibt zum Teil am Startfleck leicht gelblich zurück und zeigte zusätzlich oberhalb des Rf-Wertes von INH einen zusätzlichen gelblichen Fleck.

Durch diese Vergleichschromatogramme kann man aussagen, daß also keine weiteren störenden Flecke aufgetreten sind.

Bei dem nun folgenden Ansatz wurde die NADPH-Zugabe und die H_2O_2-Menge vergrößert:

0,2 ml INH-Lösg. 1,4 mg INH, 10^{-5} Mol
0,2 ml POD-Lösg. 1,3 mg POD
2,0 ml m/10 H_2O_2, $2 \cdot 10^{-4}$ Mol
1,5 ml NADPH-Ansatz in Puffer pH 7,6, 39 mg NADPH, $5 \cdot 10^{-5}$ Mol

Es wurde wieder 30 µg, bezogen auf INH-Einwaage, aufgetragen. INH hat hierbei abgenommen, wie ein Vergleich aus der Farbintensität der Flecken ergab. Nach einer Reaktionszeit von 27 Stunden wurde der gelbliche Fleck oberhalb von INH intensiver als der INH-Fleck selber. Neue Substanzen sind nicht nachgewiesen worden.

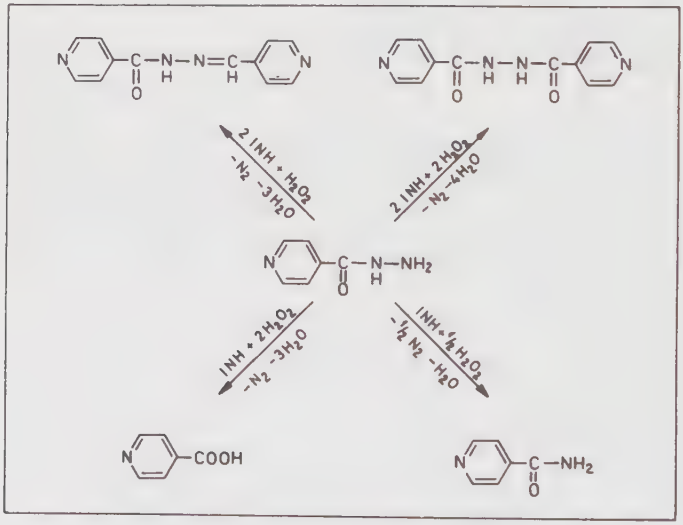
+) Glukose-6-phosphat di-Natriumsalz
++) Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase

III. DISKUSSION

Isonicotinoylhydrazin ist eine sehr reaktionsfähige Substanz. Sie wird durch Oxydationsmittel wie schwefelsaure Kaliumdichromat-Lösung oder ammoniakalische Silbernitrat-Lösung zu Isonicotinsäure und Stickstoff oxydiert.

Mit Ketonen und Aldehyden vermag INH Hydrazone in Form einer Schiffschen Base zu bilden.

Durch das Fermentsystem Peroxydase-H_2O_2 wird der Stickstoff im INH oxydiert,und es konnten folgende Oxydationsprodukte isoliert und nachgewiesen werden:

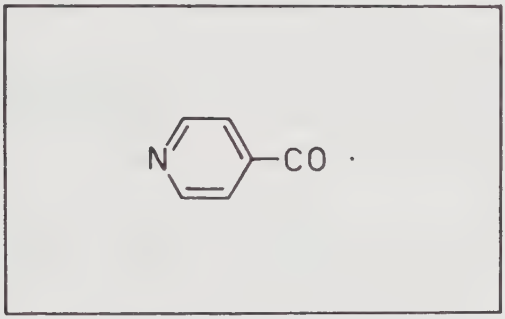


Die Umsetzungen sind hier in Form stöchiometrischer Gleichungen wiedergegeben, die Reaktionsmechanismen sollen im folgenden diskutiert werden.

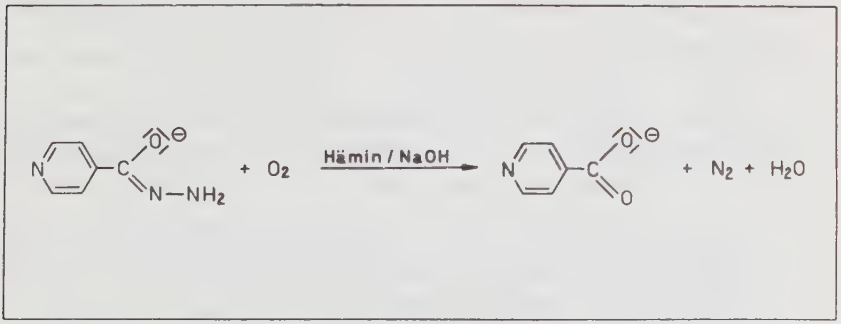
INS, DINH und IIHON waren bereits von anderen Autoren (7,9) als Produkte der Oxydation des INH durch Peroxydase und Wasserstoffperoxid nachgewiesen worden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte das INA als weiteres Reaktionsprodukt identifi-

ziert werden. Es entsteht nur in geringer Menge und ist wie die anderen Substanzen ein Endprodukt der Reaktion.

Krüger-Thiemer hat bei der Oxydation des INH die intermediäre Bildung des folgenden Radikals angenommen (57):

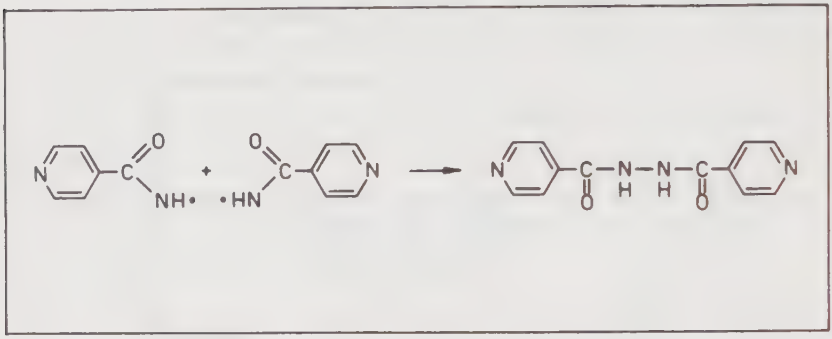


Aus diesem könnte durch Reaktion mit Wasser die INS oder durch Umsetzung mit einem anderen Molekül INH das DINH gebildet werden. Für die Oxydation des INH durch Hämin und Sauerstoff im alkalischen Medium stellt Krüger-Thiemer folgende Reaktionsgleichung auf:



Dabei nimmt er eine Enolisierung der Carbonylgruppe im alkalischen Milieu an, die auf spektrophotometrischem Wege nachgewiesen wurde (54). Für die Bildung des DINH formuliert der genannte Autor eine Reaktion der INS mit noch nicht umgesetztem INH.

Albert und Rees (9) dagegen vermuteten für die Entstehung des DINH einen Radikalmechanismus:



Mechanismen für die Bildung von IIHON und INA sind in der Literatur bisher nicht diskutiert worden.

In der Abb.22 wird ein Schema angegeben, in dem Reaktionswege für die Entstehung aller 4 Endprodukte der Reaktion zur Diskussion gestellt werden.

1) Bildung von INA: Durch die Abgabe eines Elektrons bildet sich aus dem INH das Radikal I, das zu einem Diisonicotinoyltetrazan II dimerisiert. Verbindungen diesen Typs sind instabil; sie zerfallen unter Abgabe von molekularem Stickstoff und Bildung von INA. Eine Parallele zu dieser Umsetzung bildet die von Curtius (58) beschriebene Spaltung des Benzoylphenylbuzylens, bei der unter bestimmten Bedingungen auch Benzoesäureamid auftritt.

2) Bildung von DINH: Hier sind 2 Reaktionswege vorstellbar.

   a) Nicht umgesetztes INH reagiert mit der gebildeten INS oder dem intermediären Kation V.

   b) Unter Abgabe von 2 Elektronen entsteht aus dem INH die unbeständige Zwischenstufe III, die sich zum ebenfalls unbeständigen Tetrazenderivat IV dimerisiert. Aus der Substanz IV bildet sich DINH unter Abspaltung von Stickstoff. Ein ähnlicher Mechanismus ist von Fahr und Lind für die Umsetzung von Hydrazinen mit Azodicarbonsäureestern beschrieben worden (59). Curtius und Struwe

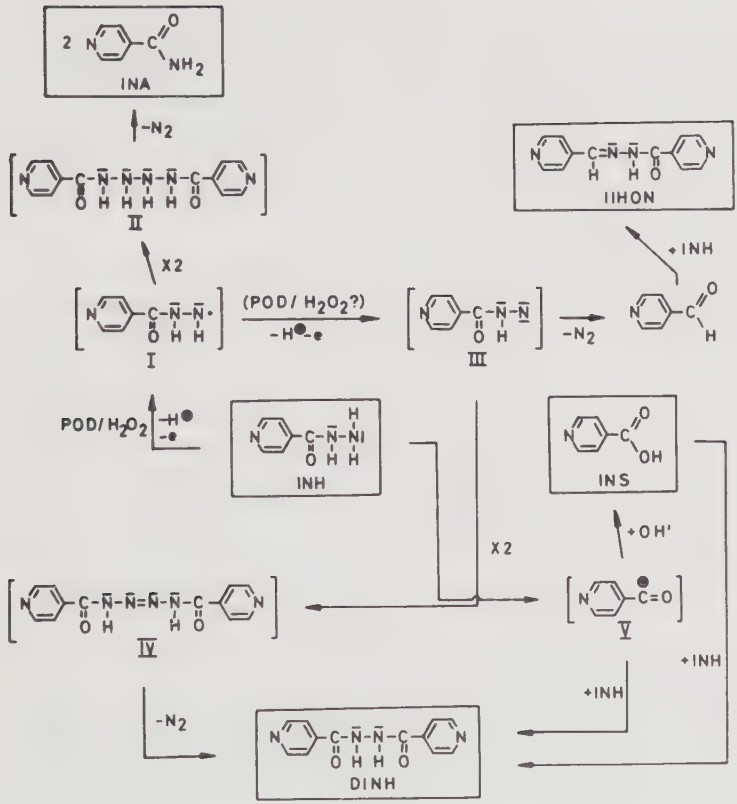


Abb.22 Möglichkeiten von Reaktionswegen bei der Umsetzung von INH mit POD-H_2O_2

erhielten bei der Oxydation von Benzhydrazid mit Jod oder HgO N,N'-Dibenzoylhydrazin.

3) Bildung von IIHON: Wie bereits von Curtius (61) sowie Kalb und Groß (62) beschrieben wurde, entstehen bei der Oxydation von Acylhydraziden u.a. die den Carbonsäuren entsprechenden Aldehyde. Als Zwischenstufe wurde das instabile Acyldiimin vermutet. In unserem Schema hat das entsprechende Intermediärprodukt die Ziffer III; unter Stickstoffabgabe entsteht hieraus Isonicotinal, das sich mit INH zu IIHON kondensiert.

4) Bildung von INS: Unter Abgabe von 4 Elektronen wird die Hydrazingruppe zu N_2 und H_2O oxydiert. Das dabei außerdem entstehende Kation V bildet mit Hydroxylionen INS.

Es wurden weiterhin Versuche zur fermentativen Hydroxylierung des INH durchgeführt. Hierzu wurde die Peroxydase in Kombination mit den Kofaktoren Dihydroxyfumarsäure, NADH oder NADPH verwendet. Es wurden bei diesen Untersuchungen keine Hydroxylierungsprodukte des INH gefunden. An der Bildung des von Tirunarayanan und Vischer (17) postulierten Dihydroxyisonicotinsäurehydrazids dürfte also die Peroxydase nicht beteiligt sein. Das als Sy identifizierte Glyoxaldiisonicotinoylhydrazon ist als ein typisches in-vitro-Produkt anzusehen und spielt in vivo sicher keine Rolle.

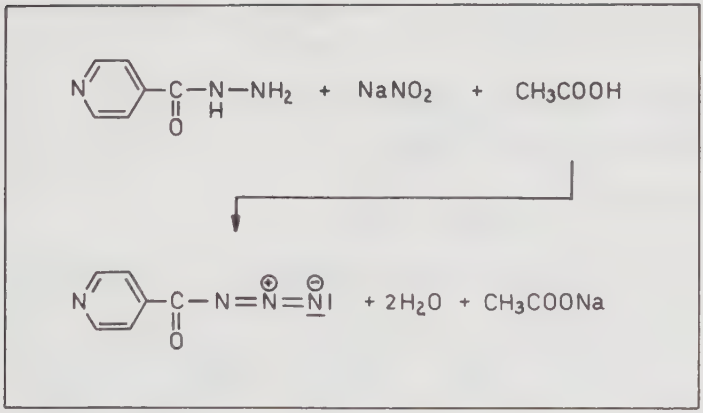
Es war der Sinn dieser Arbeit, nach den Produkten der Oxydation des INH durch Peroxydase unter verschiedenen Bedingungen zu suchen. Inwieweit diese Substanzen eine chemotherapeutische Wirksamkeit besitzen, ist eine Frage, mit der sich andere Forschergruppen beschäftigen. Vielleicht kann diese Untersuchung ein Baustein für eine der vielen diskutierten Theorien über den Wirkungsmechanismus des INH sein.

IV. PRAKTISCHER TEIL

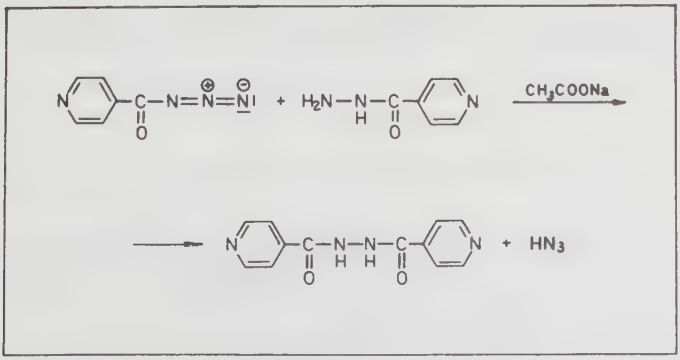
J. Darstellung der Substanzen

1.) N,N'-Diisonicotinoylhydrazin (DINH) (63)

2,0 g INH wurden in 6,0 ml 10%iger Essigsäure gelöst und mit einer Lösung von 0,5 g Natriumnitrit in 1,7 g Wasser versetzt. Hierbei bildet sich analog der Darstellung von Nicotinsäureazid nach Rohrlich (64) das Isonicotinsäureazid:



Da das Natriumnitrit im Unterschuß zugegeben wurde, es reicht nur für die halbe Menge INH aus, um daraus das Azid herzustellen, vermag die andere Hälfte des INH mit dem Isonicotin-



säureazid unter Abspaltung der Stickstoffwasserstoffsäure nach Curtius 1890, das DINH zu bilden. Im zweiten Teil der Reaktion wird das Reaktionsgemisch alkalisch, weil im ersten Teil der Reaktion sich Natriumacetat bildet, das nun alkalisch reagiert. Natriumnitrit und Essigsäure sind in äquivalenten Mengen beigegeben.

Die Reaktion erfolgte unter starker Gasentwicklung und stellt einen exothermen Vorgang dar.

Die entstandene Fällung wurde mit Wasser ausgewaschen, aus Wasser umkristallisiert und bei 105°C über P_2O_5 in der Trockenpistole getrocknet.

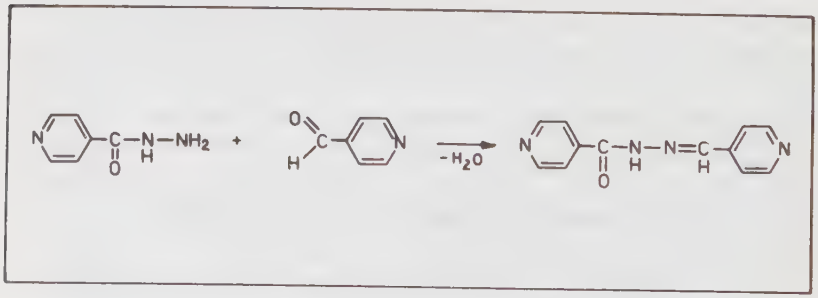
Die Ausbeute betrug 0,5 g DINH, 28% d. Th.

Schmelzpunkt: gefunden: 263°C
Lit.: 256°C

Molekulargewicht: gefunden: 253,8
berechnet: 242,2

2.) N-Isonicotinoyl-N'-Isonicotinalhydrazon (IIHON) (65)

10,0 g INH werden in Methanol gelöst und mit 8,0 g Pyridin-4-aldehyd versetzt und drei Stunden am Rückflußkühler gekocht. Hierbei bildet sich das IIHON in Form einer Schiffschen Base:



Das gebildete IIHON wurde mit Methanol gewaschen und aus viel Wasser umkristallisiert. In der Trockenpistole über P_2O_5 bei 105°C wurde IIHON getrocknet.

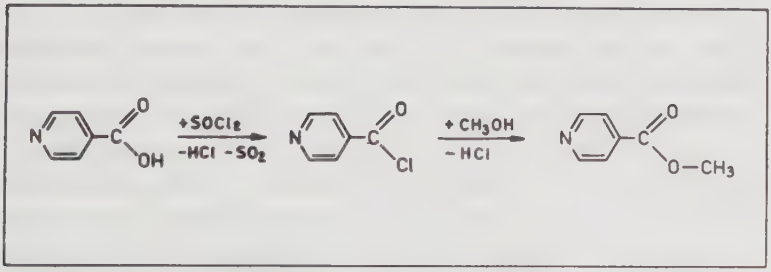
Die Ausbeute betrug 5,4 g IIHON, 66% d. Th.

Schmelzpunkt: gefunden: 237,5°C
Lit. 236°C

Molekulargewicht: gefunden: 230,5
berechnet: 226,2

3.) Isonicotinsäureamid (INA) (66)

5,0 g Isonicotinsäure (INS) wurden mit 25,0 ml frisch destilliertem Thionylchlorid behandelt und 15 Min. am Rückflußkühler erhitzt. Das überschüssige Thionylchlorid wurde mit Hilfe der Vakuumdestillation entfernt und das zurückgebliebene weißgelbe Pulver - Isonicotinsäurechlorid - wurde anschließend mit 25,0 ml Methanol am Rückflußkühler 30 Min. verestert. Mit 20%iger Sodalösung wurde neutralisiert und anschließend zweimal ausgeäthert. Mit Natriumsulfat wurde die Lösung getrocknet und der Rückstand im Vakuum destilliert (13 Torr, 88°C). Die Ausbeute betrug ca. 80% d. Th.

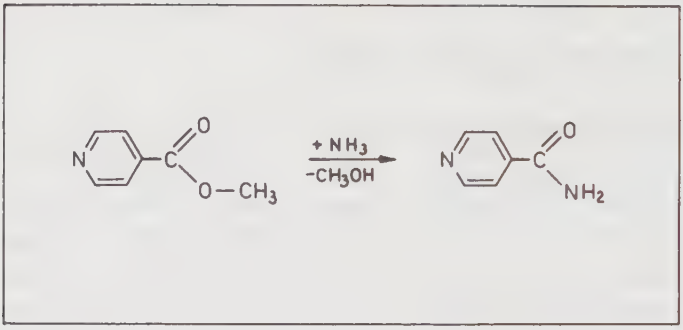


Der farblose Isonicotinsäure-methylester wurde mit 25%igem Ammoniak vermischt und die sich bildenden zwei Schichten durch kräftiges Schütteln homogenisiert. Über Nacht kristallisierte im Kühlschrank das Säureamid aus. Die Umkristallisation wurde aus siedendem Benzol vorgenommen.

Die Ausbeute betrug 0,5 g INA, 26% d. Th.

Schmelzpunkt: gefunden: 152°C
Lit.: 151-155°C

Molekulargewicht: gefunden: 124,3
berechnet: 122,1



4.) Glyoxal-diisonicotinoylhydrazon (Sy) (50)

Diese Verbindung wurde aus Glyoxal (67) und INH synthetisiert. 100,0 ml Paraldehyd, 82,0 g Selendioxid, 15,0 ml 50%iger Essigsäure und 200,0 ml Dioxan wurden in einem 500 ml Rundkolben mit einem Kugelkühler 6 Stunden erhitzt. Danach wurde abdekantiert und zweimal mit je 50,0 ml Wasser der organische Rückstand ausgewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden mit der Wasserdampfdestillation von Paraldehyd und Dioxan befreit. Mit Hilfe von Bleiacetat wurde in Lösung gegangenes Selensalz ausgefällt. Nach dem Filtrieren wurde das überschüssige Bleiacetat mit Schwefelwasserstoff entfernt. Die Lösung wurde mit Aktivkohle wasserklar filtriert und auf dem Wasserbad unter vermindertem Druck zu etwa 200 ml eingeengt.

Das so erhaltene polymere Glyoxal wurde am Rückflußkühler auf 51°C erwärmt. Bei dieser Temperatur geht das Polymerisat in das monomere Glyoxal über (68).

Zu 100 ml Glyoxallösung wurden 50 ml erwärmte 6%ige INH-Lösung hinzugegeben. Nach kurzem Aufkochen des Reaktionsgemisches entstand die gesuchte Verbindung, die aus Eisessig umkristallisiert wurde.

Schmelzpunkt: gefunden: ca. 360°C unter Zersetzung
Lit.: über 360°C (50)

5.) Acetylierung von Glyoxal-diisonicotinoylhydrazon bzw. Sy

200 mg Glyoxal-diisonicotinoylhydrazon wurden in 25 ml Acetanhydrid und 7 ml Pyridin unter Rückfluß solange erhitzt,

bis die Substanz aufgelöst war. Die schwach-braune Lösung wurde filtriert und 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, danach wurde sie in Eiswasser gegossen. Da sich keine Kristallbildung einstellte, wurde im Umlaufverdampfer mit eisgekühlter Vorlage vorsichtig eingeengt. Nach der Zugabe von 2-3 ml Wasser fiel das acetylierte Glyoxal-diisonicotinoylhydrazon über Nacht im Kühlschrank aus.

Aus Äthanol umkristallisiert wurden farblose rhombische Kristalle erhalten, die über P_2O_5 in der Trockenpistole einen Schmelzpunkt von 243°C ergaben.

6.) Sonstige Substanzen

Die Ausgangssubstanz Isonicotinsäurehydrazid MG 137,1, Schmelzintervall 170-172°C und Isonicotinsäure MG 123,1, Schmelzpunkt 317°C wurden von der Chemischen Fabrik Fluka besorgt.

N-Isonicotinoyl-N'-acetylhydrazin MG 165,2, Schmelzpunkt 150°C, UV-Spektrum λ max 264 nm und N-Isonicotinoylglycin MG 168,2, Schmelzpunkt 230°C unter Zersetzung, UV-Spektrum λ max 268,5 nm wurden von der Farbenfabrik Bayer-Wuppertal zur Verfügung gestellt +).

K. Isolierung der Substanzen Sx und Sy

1.) Isolierung der Substanz Sx (INA)

Aus den dünnschichtchromatographischen Untersuchungen der Oxydation des INH mit POD wurde der Oxydationsansatz abgeleitet, um daraus Sx zu isolieren. Der Großansatz hatte folgende Zusammensetzung:

598 mg INH/ 75 ml bidest. Wasser
605 mg POD/ 60 ml bidest. Wasser
90 ml m/10 H_2O_2

Der Puffer wurde bei diesem Ansatz weggelassen, weil das Oxydationsprodukt Sx im pH-Bereich 4-9 gleichmäßig auftrat, und um die Isolierung zu erleichtern.

Nach ca. 18 Stunden Reaktionszeit wurde lyophilisiert, Vorkühlzeit 2 Std. bis -29°C, 0,3-0,2 Torr. Nach 6 Std. Gefriertrocknung in der Apparatur Delta (M. Christ, Osterode)

+) Herrn Dr. Offe, Farbenfabriken Bayer-Wuppertal, wird für die Überlassung der Substanzen freundlichst gedankt.

wurde der Rückstand mit 80 ml Methanol extrahiert. Nach dem Einengen auf ca. 10 ml am Büchli-Umlaufverdampfer wurde die Lösung auf Kieselgelplatten (HF_{254} "Merck", Darmstadt, 1,5 mm dick) als Streifen aufgetragen, 40 mg bezogen auf INH-Einwaage in 2 ml Lösung auf 20 cm. Es wurde zweimal mit Aceton entwickelt. Nach Detektion im UV-Licht 254 nm wurde der Streifen mit dem höchsten Rf-Wert abgeschabt und die Substanz Sx mit Wasser vom Träger gelöst. Das Wasser wurde im Vakuum abdestilliert und der Rückstand mit Methanol aufgenommen, erneut abdestilliert und schließlich aus siedendem Benzol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 9,8 mg Sx (INA).

2.) Isolierung der Substanz Sy (Glyoxal-Diisonicotinoyl-hydrazon)

Folgender Ansatz wurde bei Zimmertemperatur 18 Stunden der Reaktion ausgesetzt:

500 ml DHF-Lösg. (1,0 g DHF)
200 ml INH-Lösg. (1,0 g INH)
200 ml m/10 H_2O_2

Nach 18 Stunden wurde der sich bildende Niederschlag, wie bereits in den Voruntersuchungen berichtet, durch eine Fritte abgesaugt. Das Filtrat wurde am Umlaufverdampfer eingeengt und der noch angefallene Rückstand abgenutscht.

Die vereinigten Ausfällungen wurden in Wasser ausgekocht, damit noch vorhandene DHF bzw. INH gelöst wird. Der Rückstand war im Wasser unlöslich sowie auch in den meisten organischen Lösungsmitteln. Die Umkristallisation gelang aus Dimethyformamid, später hat sich Eisessig als vorteilhafter erwiesen. Es wurde aber jedesmal viel Lösungsmittel gebraucht. Es wurden hellgelbe rhombische Kristalle erhalten, die in der Trockenpistole über P_2O_5 einen Schmelzpunkt von ca. 360°C unter Zersetzung ergaben.

Elementaranalyse: N: berechnet: 22,2%, gefunden: 22,38% +)
C: berechnet: 56,9%, gefunden: 57,34% +)
H: berechnet: 4,24%, gefunden: 4,36%

Molekulargewicht: Einzelwerte: 369 und 375,
gemessen in $CHCl_3$ Mittelwert: gefunden: 372
berechnet: 380,4

Die berechneten Werte bestätigten folgende Summenformel, nach-

dem für die Atome folgende Anzahlen berechnet wurden:

N: 5,94, C: 17,75, H: 16,2, O: 3,72 für acet. Sy. Die Summenformel lautet: $C_{18}H_{16}N_6O_4$.

Um nun die Summenformel für Sy aufstellen zu können, mußte eine Acetylgruppenbestimmung +) durchgeführt werden:

$OCCH_3$: berechnet: 22,6% gefunden: 22,44%

Die Berechnung ergab, daß die acetyl. Sy 2 Acetylgruppen enthielt und damit beläuft sich das Molekulargewicht von Sy auf

Mol-Gew.: berechnet: 294,3 gefunden: 288,5
Daraus errechnet sich die Summenformel für Sy: $C_{14}H_{12}N_6O_2$.

Die berechneten Werte stimmen mit der Summenformel von Glyoxal-diisonicotinoylhydrazon überein.

L. Peroxydase-Aktivitätsbestimmung

1.) Aktivitätsbestimmung der Peroxydase (32)

0,03 ml Fermentlösung, deren Konzentration nach Möglichkeit so gewählt wurde, daß die Extinktionserhöhung nicht über 60 sec. dauerte, und 0,05 ml 0,02 m Guajakollösung wurden mit 2,9 ml 0,01 m Phosphatpuffer (pH 7) in einer Küvette von 1,000 cm Durchmesser gemischt. Mit Hilfe einer Glasöse wurde 0,02 ml 0,04 n H_2O_2-Lösung (F=1,0003) unter schnellem und gründlichem Umrühren hinzugegeben und zugleich die Stoppuhr betätigt. Die Messung der Extinktion (zu Anfang die Extinktion ohne H_2O_2-Zugabe und dann die Extinktionserhöhung um 0,050 Einheiten) wurde bei 470 nm und einer Spaltbreite von 0,015 bei t = 25°C im Spektralphotometer vorgenommen. Die Vergleichslösung enthielt Wasser. Aus der Tab.11 können die einzelnen Werte entnommen werden.

Die Reinigung des Guajakols wurde unter Zusatz von 0,5% Soda durch Vakuumdestillation (13 Torr, 87°C) und anschliessender Umkristallisation aus Petroläther vorgenommen.

Die H_2O_2-Lösung wurde aus 30%igem Perhydrol "Merck" hergestellt und jodometrisch eingestellt.

+) Die C-H-Bestimmung und die Acetylgruppenbestimmung wurden im Mikroanalytischen Labor A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr, durchgeführt.

Der Phosphatpuffer pH 7 wurde aus 1 Teil m/100 KH_2PO_4 und 1 Teil m/100 Na_2HPO_4 hergestellt und elektrometrisch eingestellt.

Die Fermentstandardlösung enthielt 59,9 mg POD in 10,00 ml bidest. Wasser gelöst. Die Lösung wurde 1:100 verdünnt.

Versuchs-nummer	E ohne H_2O_2	E ohne H_2O_2 + 0,050	Zeit t	E-Höchstwert
1.	0,006	0,056	27,2"	0,592
2.	0,002	0,052	27,0"	0,672
3.	0,000	0,050	28,1"	0,605
4.	0,004	0,054	26,3"	0,601
5.	0,001	0,051	26,6"	0,576
6.	-0,002	0,048	26,1"	0,548
Mittelwert			26,9"	0,599

Tab.11 Werte der Aktivitätsbestimmung von Peroxydase nach der Methode von Chance und Maehly

2.) Berechnung der Fermentkonzentration

Die Fermentkonzentration wird nach folgender Gleichung ermittelt:

$$e = \frac{\Delta x}{k_4 \cdot a \cdot \Delta t}$$

Dabei ist:

e = Enzymkonzentration in Mol/Liter
k_4 = $3,3 \cdot 10^5$ Liter/Mol·sec (bei 25°C) = Geschwindigkeitskonstante
a = $3,33 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter = Anfangskonzentration des Guajakols
Δx = $7,52 \cdot 10^{-6}$ Mol/Liter = Änderung der Wasserstoffperoxidkonzentration während der Messung
Δt = Zeit in Sekunden für die Erhöhung der Extinktion um 0,050 Einheiten, bei dieser Messung 26,9".

Nach Einsetzen der Zahlen in die Gleichung wurden folgende Werte erhalten:

$e = 2,5 \cdot 10^{-9}$ Mol/Liter Reaktionslösung bzw.
$e = 4,2 \cdot 10^{-9}$ Mol/mg Trockensubstanz Peroxydase.

Für die Untersuchungen über die Inhibition der POD durch INH und seine Oxydationsprodukte wurde eine neue Charge Peroxydase der Fa. Boehringer, Mannheim, verwendet, so daß eine erneute Aktivitätsbestimmung erforderlich war. Diese wurde nach der gleichen Methode wie vorher bestimmt und ergab folgende Werte:

Δt = 29,1 sec für die Extinktionserhöhung von 0,050 Einheiten
E-Höchstwert: 0,724
e = $2{,}35 \cdot 10^{-9}$ Mol/Liter Reaktionslösung bzw.
e = $3{,}92 \cdot 10^{-9}$ Molmg Trockensubstanz POD

M. Herstellung der Pufferlösungen

1.) Herstellung der Stammlösungen

a.) Glykokoll 0,1 n (7,505 g Glykokoll und 5,85 g Natriumchlorid werden in einem Liter gelöst (69)

b.) Natriumcitrat, 0,1 m (21,008 g Citronensäure-Monohydrat und 200 ccm n-Natronlauge im Liter gelöst) (70)

c.) Primäres Kaliumphosphat 1/15 m (9,078 g KH_2PO_4 im Liter) nach Mc Ilvain (71)

d.) Sekundäres Natriumphosphat 1/15 m (11,876 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ im Liter) nach Mc Ilvain (71)

e.) Natriumborat 0,2 m (12,404 g Borsäure und 100 ccm n-Natronlauge im Liter) (70)

Die Pufferstammlösungen wurden alle mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

2.) Herstellung der Pufferlösungen

pH 3: 40,3 ml 0,1 m Natriumcitratlösg. und 59,7 ml 0,1 n Salzsäure.

pH 4: 56,0 ml 0,1 m Natriumcitratlösg. und 44,0 ml 0,1 n Salzsäure

pH 5: 0,95 ml 1/15 m sekundäre Natriumphosphatlösg. und 99,05 ml 1/15 m primäre Kaliumphosphatlösg.

pH 6: 12,1 ml 1/15 m sekundäre Natriumphosphatlösg. und 87,9 ml 1/15 m primäre Kaliumphosphatlösg.

pH 7: 61,2 ml 1/15 m sekundäre Natriumphosphatlösg. und 38,8 ml 1/15 m primäre Kaliumphosphatlösg.

pH 8: 55,85 ml 0,2 m Natriumboratlösg. und 44,15 ml 0,1 n Salzsäure.

pH 9: 12,4 ml 0,1 n-Natronlauge und 87,6 ml 0,1 n-Glykokoll.

Alle Pufferlösungen wurden elektrometrisch im pH-Meßgerät der Firma Knick, Berlin-Zehlendorf, eingestellt.

N. Herstellung der Meßlösungen für die UV-Spektroskopie

Es wurden folgende Ausgangslösungen hergestellt:

a) 12,2 mg INA in 100,00 ml bidest. Wasser gelöst
b) 13,7 mg INH in 100,00 ml " " "
c) 12,3 mg INS in 100,00 ml " " "
d) 24,2 mg DINH in 100,00 ml " " "
e) 22,6 mg IIHON in 1000,00 ml" " "

Von diesen Lösungen (a - d) wurden jeweils 10,00 ml auf 100,00 ml mit bidestilliertem Wasser ergänzt. Die so hergestellten Meßlösungen enthielten jeweils 10 µ Mol der Substanz in 100 ml.

Von der Lösung e wurden 25,00 ml entnommen und auf 100,00 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Die Meßlösung enthielt nur 2,5 µ Mol.

Als Vergleichslösung wurde bidestilliertes Wasser genommen.

Für die UV-Spektroskopie von Glyoxal-diisonicotinoylhydrazon (Sy) und von dem acetylierten Glyoxal-diisonicotinoylhydrazon (acet.Sy) mußte wegen der besseren Löslichkeit Dimethylformamid für Sy und Chloroform für acet.Sy als Lösungsmittel benutzt werden. Es wurden folgende Ausgangslösungen hergestellt:

f) 10,1 mg Sy in 100,00 ml dest. Dimethylformamid gelöst.
g) 13,0 mg acet. Sy in 100,00 ml dest Chloroform gelöst.

Von der Lösung f) wurden 10,00 ml entnommen und zu 100,00 ml dest. Dimethylformamid gelöst. Die Vergleichslösung für die UV-Messung bestand aus dest. Dimethylformamid. Die Meßlösung enthielt 3,42 µ Mol.

Von der Lösung g) wurden 10,00 ml entnommen und zu 100,00 ml dest. Chloroform gelöst. Die Vergleichslösung zur UV-Messung enthielt dest. Chloroform. Die Meßlösung enthielt 3,42 µ Mol.

0. Dünnschicht- und Säulenchromatographie

1.) Dünnschichtchromatographie

Für die DC wurden die Geräte der Firma Desaga, Heidelberg, verwandt. Als Sorbens wurde Kieselgel HF_{254} der Firma Merck, Darmstadt, gewählt. Als Laufmittel die handelsüblichen Lösungsmittel Aceton, Dioxan, 25% Ammoniak (90:10:4 v/v). Laufhöhe 14 cm, Entwicklungsdauer einer Platte ca. 35-40 Minuten, Schichtdicke der Kieselgelplatten 0,25 mm. Bei Reaktionsansät-

zen mit INH wurde immer die Menge aufgetragen, die auf die Einwaage von INH bezogen 30 µg entspricht.

2.) Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie bei der Suche nach einer quantitativen Bestimmungsmethode wurden folgende Sorbentien angewandt:

Kieselgel 0,2-0,5 mm der Firma Merck, Darmstadt.

Aluminiumoxid, sauer, neutral, basisch der Firma Woelm, Eschwege, Akt. Stufe I.

Cellulose-Ionenaustauscher der Firma Serva, Heidelberg, Typ P Kapazität 1,17, Typ SE Kapazität 0,20, Typ CM Kapazität 0,88.

Kationenaustauscher, harzförmig der Firma Merck, Darmstadt, stark sauer Merck I und Amberlite stark sauer, IR 120 der Firma Röhm und Haas, Philadelphia, USA. Das Reaktionsgemisch sollte von der Säule mit 0,001 n, 0,01 n, 0,1n, 1n HCl eluiert werden.

Anionenaustauscher, harzförmig, Merck III stark basisch, der Firma Merck, Darmstadt. Eluiert wurde mit 0,001 n, 0,01 n, 0,1 n, 1 n NaOH.

P. Fällung der Substanzen mit Hilfe von Metallionen

Es wurde folgende Arbeitsweise durchgeführt:

Die entsprechende ca. 1%ige Metallsalzlösung wurde tropfenweise zu dem Reaktionsgemisch gegeben, bis keine weitere Fällung mehr auftrat. Das Filtrat wurde durch H_2S von den Metallionen befreit. Der Rückstand wurde durch 1% HCl aufgelöst, H_2S eingeleitet, um die Metallionen wieder abzutrennen.

Das nun verbleibende Filtrat wurde dünnschichtchromatographisch untersucht.

Q. Reinigung und Bestimmung des Hämins

1.) Reinigung von Hämin nach Fischer (46)

Das aus Rinderblut nach Gattermann und Wieland (72) hergestellte Hämin wurde nun wie folgt gereinigt:

2,0 g Hämin wurden in einem 50 ml Erlenmeyerkolben mit 10,0 ml

Pyridin übergossen und bis zur vollständigen Lösung geschwenkt. Nach dem Zusatz von 16 ml Chloroform wurde der Kolben mit einem Korken verschlossen und 15 Minuten geschüttelt. Nach dem Filtrieren der Lösung und Nachwaschen des Filters und des Kolbens mit 6 ml Chloroform wurde das Filtrat in ein zum Sieden erhitztes Gemisch aus 140 ml Eisessig, 2,0 ml gesättigter Natriumchloridlösung und 1,6 ml konz. Salzsäure unter ständigem Rühren gegossen. Nach 12 Stunden wurden die ausgeschiedenen Kristalle auf einer Nutsche gesammelt, nacheinander mit 20 ml 50% Essigsäure, 40 ml Wasser, 10 ml Äthanol und 10 ml Äther gewaschen und anschließend über P_2O_5 in der Trockenpistole getrocknet. Die Ausbeute betrug 1,6 g Hämin.

2.) Bestimmung des Hämins als Pyridinhämochromogen-Komplex (47)

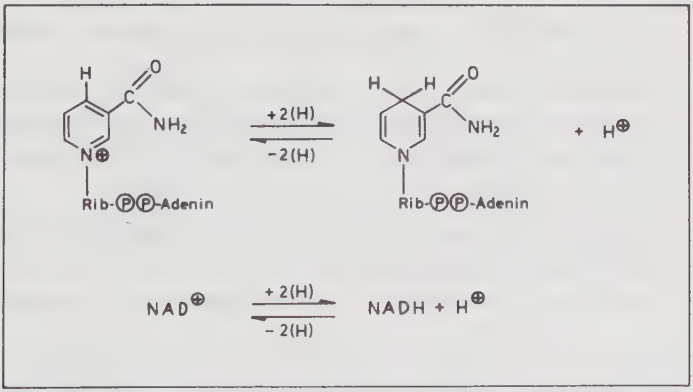
Die Bestimmung erfolgte in einer wäßrigen Lösung, die 25% Pyridin (v/v), 10% 1 n Natronlauge (v/v) und 1% $Na_2S_2O_4$ (g/v) enthielt. Das Pyridin wurde aus schwefelfreier Ware nach mehrtägigem Stehen über Ätznatron durch fraktionierte Destillation gewonnen. Zur Herstellung einer Häminstammlösung wurden 1,4mg Hämin in 20 ml Pyridin gelöst und die Lösung mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Zur Überprüfung des Lambert-Beerschen Gesetzes wurden dieser Lösung 2, 5, 10 und 20 ml für eine Bestimmung entnommen. In einem 100 ml Meßkolben wurden diese Mengen mit 24,6, 24, 23, 21 ml Pyridin, sowie 10 ml 1 n NaOH und 1 g $Na_2S_2O_4$ versetzt. Die Kolben wurden bis zur Marke aufgefüllt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 557 nm (Maximum der Lage der α-Bande des Pyridinhämochromogen-Komplexes, die vor der Bestimmung überprüft wurde) in Küvetten von 1,000 cm Schichtdicke gegen eine Blindlösung, die alle Bestandteile der Meßlösung mit Ausnahme des Hämins in gleicher Konzentration enthielt. Die Färbung erreichte bereits nach 5 Minuten ihre höchste Intensität (E = 1,35) und blieb etwa 25 Minuten konstant. Der Wert betrug $\varepsilon = 2{,}835 \cdot 10^7$ cm^2/Mol.

R. UV-Spektrum von NADH bzw. NADPH und Reduktion von NADP zu NADPH

1.) UV-Spektrum von NADH bzw. NADPH

Da NADH längere Zeit im Kühlschrank gelagert hatte, sollte seine Aktivität überprüft werden.

Die Übertragung des Substratwasserstoffs auf den Pyridinring in 4-Stellung des Nicotinsäureamids von NADH bzw. NADPH führt zur Lichtabsorption mit einem Maximum bei 340 nm. Wie ersichtlich,wird gleichzeitig die aromatische Natur des Ringes aufgehoben, das Dihydropyridinsystem absorbiert also bei 340 nm, während das Pyridinsystem hier nicht absorbiert (73).



Es wurden für die Meßlösungen 0,1 µMol (70,9 µg) in 3 ml bidest. Wasser gelöst. Das Spektrum zeigt zwei Maxima wie auch in der Literatur (74,75) angegeben.

a) λ=260 nm, E = 0,468, wird hervorgerufen durch den Adeninkörper im Molekül.

b) λ=339 nm, E = 0,146, das von dem monohydrierten Pyridinring herrührt.

Ein Minimum befindet sich bei λ=234 nm, und das andere bei λ=298 nm.

An der Extinktion bei 339 nm läßt sich die enzymatische

Hydrierung des Substrates in der Photoküvette direkt verfolgen. Bei einem Lichtweg von 1,000 cm wird nach dem Lambert-Beerschen Gesetz für den Umsatz von 1 µMol Substrat/ml der molare Extinktionskoeffizient berechnet: $\varepsilon = 6{,}1 \cdot 10^6$ cm^2/Mol. Der Literaturwert (56) wird mit $\varepsilon = 6{,}22 \cdot 10^6$ cm^2/Mol angegeben.

2.) Enzymatische Reduktion von NADP zu NADPH mit Glukose-6-phosphat (G6P) und Glukose-6-phosphat-dehydrogenase (G6P-DH)

Da für die Versuche nur NADP zur Verfügung stand, mußte es reduziert werden zu NADPH.

Das Ferment G6P-DH katalysiert die Dehydrierung von G6P mit NADP:

$$\text{G6P} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G6P-DH}} \text{6-Phosphogluconolacton} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Entsteht nun während der Reaktion NADPH, so nimmt die Absorption bei 340 nm allmählich zu. Der Anstieg der Lichtabsorption kann bequem gemessen werden, und damit der Übergang $NADP^+$ zu NADPH optisch verfolgt werden.

Die Methode wurde aus der Literatur von Bergmeyer (75) entnommen. Der Reduktionsansatz wurde mit Rücksicht auf die weitere Verwendung mit POD und INH folgendermaßen berechnet:

Substanz	MG	Menge	Mol	Stammlösung
NADP-Na	765,4	50,8 mg	$6{,}5 \cdot 10^{-5}$	Trockensubstanz
$MgCl_2$	95	95,0 mg	10^{-4}	23,6 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$/ 100ml
$G6P\text{-}Na_2$	349,1	70,2 mg	$2 \cdot 10^{-4}$	Trockensubstanz
Puffer pH 7,6	-----	74,2 mg Salzmenge	$4 \cdot 10^{-1}$	18,55 g Triäthanolamin 1,45 g NaOH/250ml
G6P-DH	4000 E / mg / ml	0,025 ml/ 25 µg/100E	------	1:4 verdünnt

NADP-Na und $G6P\text{-}Na_2$ wurden in 0,86 ml $MgCl_2$-Lösung und 1,0 ml Puffer gelöst. Hierzu wurde 0,1 ml der verdünnten G6P-DH-Lösung hinzugegeben. Nach 50 Minuten war die Reduktion des $NADP^+$ beendet.

Der Puffer wurde folgendermaßen dargestellt: 18,55 g frisch umkristallisiertes Triäthanolaminhydrochlorid wurde mit 1,45 g NaOH (Merck) in 250 ml bidestilliertem Wasser gelöst, und elektrometrisch auf pH 7,6 eingestellt.

Die G6P-Suspension (1 mg/ml G6P-DH in 3,3 m Ammoniumsulfat-Lösung) wurde im Verhältnis 1:4 verdünnt.

S. Enzyme und Kofaktoren

Peroxydase, gereinigt von der Firma C.F. Boehringer u. Söhne, GmbH, Mannheim.

Dihydroxyfumarsäure, wasserfrei, purum, von der Firma Carl Roth OHG, Karlsruhe-West.

Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat von der Firma E. Merck AG, Darmstadt.

Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert, Natriumsalz, von der Firma C.F. Boehringer und Söhne, GmbH, Mannheim.

Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Suspension 1 mg/ml 3,3 m Ammoniumsulfat-Lösung, für analytische Zwecke, von der Firma C.F. Boehringer und Söhne, GmbH, Mannheim.

Glukose-6-phosphat di-Natriumsalz von der Firma C.F. Boehringer und Söhne, GmbH, Mannheim.

V. MESSTECHNISCHER TEIL

1.) Schmelzpunktbestimmung

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mit einem Linström-Block. Die angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

2.) Molekulargewichtsbestimmung

Bei Verwendung von Chloroform oder Aceton als Lösungsmittel wurden die Messungen in einem Dampfdruckosmometer der Firma Mechrolab Inc., Calif., USA, Modell 301 A, bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt.

3.) Einstellung von Pufferlösungen

Die Einstellung der Pufferlösungen erfolgte im pH-Meter, Modell 26 der Firma Knick, Berlin.

4.) NMR-Spektrum

Das Kernresonanzspektrum wurde mit dem Spektrometer Varian A 60 mit Trifluoressigsäure aufgenommen.

5.) UV-Spektren

Die Absorptionspektren wurden mit einem Spektralphotometer der Firma Zeiss, Oberkochen, Modell PMQ II, aufgenommen. Für alle Messungen wurden Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke verwendet.

Für die Inhibitionsuntersuchungen wurde das Spektralphotometer der Firma Zeiss, Oberkochen, Modell PMQ III mit automatischer 100-Punkt-Einstellung benutzt.

6.) IR-Spektren

Die IR-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer-Spektralphotometer Modell 237 E in KBr aufgezeichnet.

7.) Stickstoff-Bestimmung

Die N-Bestimmung wurde im Nitrogen-Analyzer nach Coleman ausgeführt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Oxydation von INH durch Peroxydase und H_2O_2 durchgeführt. Zu diesen Versuchen wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die Kofaktoren DHF, NADH und NADPH hinzugegeben.

Eine der ersten Aufgaben bestand in der Suche nach einer schnelleren Identifizierung und Auftrennung der Oxydationsansätze von INH und bereits bekannter Oxydationsprodukte: INS, DINH und IIHON (7). Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie konnte der Nachweis von INH, DINH, IIHON und INS empfindlicher gestaltet werden, die Auftrennung wurde in kürzerer Zeit erreicht.

Aus dem Oxydationsansatz INH-POD-H_2O_2 konnte neben den schon bekannten Substanzen INS, DINH und IIHON ein weiteres Reaktionsprodukt (Sx) gefunden werden. Diese Substanz wurde isoliert und durch Synthese als Isonicotinoylamid (INA) nachgewiesen. INA, das aus dem Enzymansatz durch präparative Schichtchromatographie isoliert wurde,und das authentische Produkt zeigten gleiche Rf-Werte und Farbreaktionen auf DC, IR- und UV-Spektren, Schmelz- und Mischschmelzpunkte.

Die Entstehung der Substanzen DINH und IIHON im Enzymansatz zeigte sich pH-abhängig, die Bildung von IIHON war begünstigt im sauren, die des DINH mehr in dem basischen Bereich.

Die POD-Konzentration hatte ebenfalls Bedeutung. Bei Inhibitionsuntersuchungen von INH und seinen Oxydationsprodukten nach der Guajakolmethode stellte sich heraus, daß zwischen INH und Guajakol eine Konkurrenzreaktion stattfand. Alle Oxydationsprodukte störten die POD-Aktivitätsbestimmung nach der Chance-Maehly-Methode nicht. Sie wurden nicht weiter enzymatisch oxydiert und erwiesen sich als Endprodukte.

Die Oxydation von INH mit Hämin-H_2O_2 führte zu den gleichen Resultaten wie bei den Ansätzen INH-POD-H_2O_2.

Die Enzymansätze wurden unter Zugabe der Kofaktoren DHF, NADH und NADPH fortgesetzt. Hierbei wurde aus dem Ansatz INH-POD-DHF-H_2O_2 eine Substanz Sy gefunden, die auch ohne POD-Zugabe entstand. Nach der Isolierung von Sy wurde über

sein Acetylderivat das Molekulargewicht und die Summenformel ermittelt, nachdem eine Elementaranalyse, Acetylgruppenbestimmung, NMR-Spektrum und oxydimetrische Titration mit Kaliumdichromat durchgeführt wurde. Der Nachweis der Strukturformel erfolgte durch Synthese der Substanz Glyoxal-diisonicotinoylhydrazon. Die Übereinstimmung der beiden Substanzen aus dem INH-DHF-H_2O_2-Ansatz und aus der Synthese erfolgte durch UV-, IR-Spektren, Schmelz- und Mischschmelzpunkte, Rf-Werte und Farbreaktion auf DC.

Die Oxydation von INH mit POD-NADH bzw. NADPH-H_2O_2 ergab keine neuen Ergebnisse. Eine Hydroxylierung von INH konnte weder bei dem Ansatz POD-DHF-H_2O_2 noch bei POD-NADH bzw. NADPH-H_2O_2 nachgewiesen werden.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1) J.Mally und H.Meyer, Mh.Chem. 33 (1912) 393-414, ref. Jahresberichte Borstel 4 (1957) 412

2) E.Grunberg und K.J.Schnitzer, Quart.Bull.Sea View Hosp. 13 (1952) 3-11, ref. Jahresberichte Borstel 4 (1957) 308, 394

3) H.A.Offe, W.Siefken und G.Domagk, Z.Naturforsch. 7b (1952) 462-468

4) Jahresberichte Borstel 3 (1956) 192-424, Springer-Verlag

5) Jahresberichte Borstel 4 (1957) 299-509, Springer-Verlag

6) E.Krüger-Thiemer, Naturwissenschaften, 42 (1955) 47-48

7) E.Krüger-Thiemer, Vortrag auf dem 7. internat. Kongress für Mikrobiologie in Stockholm 4.-9.8.1958, Untersuchungen zum Wirkungsmodus des INH

8) E.Krüger-Thiemer, Vortrag auf der 6. Tagg. der Oesterr. Ges. für Mikrobiologie u. Hygiene, auf dem Semmering bei Wien 25.11.1958, Untersuchungen zum Wirkungsmodus des Isoniazids

9) A.Albert und C.W.Rees, Biochem.J. 61 (1955) 128-131

10) E.Krüger-Thiemer ref. 5) 326

11) W.Kaeppler, Wiss.Z.Karl Marx Univ.Leipzig, math.-naturwiss. R. 13 (1964) 1164, ref. C.A. 66 (1967) 1655

12) B.C.Saunders, A.G.Holmes-Siedle und B.P.Stark, Peroxydase, London, Butterworth (1964) 40 ff.

13) Osamu Hayaishi, Oxygenases, Academic Press, New York und London (1962) 277 ff.

14) E.Krüger-Thiemer, Beiträge zur Klinik der Tuberkulose, 117, Heft 1 (1957) 179-186

15) H.J.Nestler, Arzneimittel-Forsch. 16 (1966) 1442-1447

16) F.Winder, F.Amer.Rev.Tbc 73 (1956) 779, ref. Arzneimittel-Forsch. 16 (1966) 1443

17) M.O.Tirunarayanan und W.A.Vischer, Naturwissenschaften, 44 (1957) 11-12

18) V.Nitti und G.Curci, Arch.Tisiol.Napoli 8 (1953) 859-916, ref. 5) 306, 334

19) R.Knox, J.gen.Microbiol. 12 (1955) 191-202, ref. 8)

20) J.R.Maher, J.F.Speyer und M.Levine, Amer.Rev.Tbc 75 (1957) 517-518, ref. 8)

21) R.Bönicke, Z.Hyg. 142 (1956) 347-362, ref. 8)

22) E.Krüger-Thiemer, Naturwissenschaften, 44 (1957) 425

23) D.S.J.Goldman, J.Amer.chem.Soc. 76 (1954) 2841

24) J.Imsande und P.Handler, J.biol.Chemistry 236 (1961) 525

25) S.A.Narrod, V.Bonavita, E.R.Ehrenfeld und N.O.Kaplan, J.biol.Chemistry 236 (1961) 931

26) E.Krüger-Thiemer, ref. 5) 304-305

27) A.Bekierkunst, Science, 152 (1966) 525-526, ref. Intern. Pharm.Abstr. 3 (1966) 1361d

28) W.Diller, E.Krüger-Thiemer und E.Wempe, Arzneimittel-Forsch. 9 (1959) 432-439

29) F.Feigl, Spott-Tests II, Organic Application, 4.Aufl. (1954) Elsevier Public Comp. Amsterdam, Houston, London, New York, 212

30) L.Weinryb, Biochemistry (Eng.) 5 (1966) 2003-2008

31) A.Andrejew, Ch.Gernez-Rieux und A.Tacquet, Bull.Soc.Chim. biol. 41 (1959) 7-8

32) B.Chance und A.C.Maehly, Method in Enzymology, Academ. Press. New-York, Vol 2, (1955) 770

33) B.C.Saunders, Roy.Inst.Chem. (London), Lectures, Monographs and Reports No I (1957) 559

34) H.Loth und K.D.Hengstmann, Naturwissenschaften 53 (1966) 306

35) E.Krüger-Thiemer, persönliche Mitteilung

36) J.H.Peters, K.S.Miller, P.Brown, Ann.Biochem. 12 (1965) 379-394

37) E.Krüger-Thiemer, ref. 5) 363-370

38) Gh.Ciogolea, Gh.Morait, N.Teodoresen und L.Petroniu, Farmacia (Rumänien) 12 (1964) 401-405; ref. Intern. Pharm.Abstr. 2 (1965) 594d

39) B.Modrzejewski und S.Zommer, Z.analyt.Chem. 207 (1965) 77

40) W.Brügel, Einführung in die Ultraspektroskopie, Dr.Dietrich Steinkopf Verlag, Darmstadt, 3.Aufl. (1962) 386-387

41) L.J.Bellamy, Ultrarot-Spektren und chemische Konstitution, Dr.Dietrich Steinkopf Verlag, Darmstadt, 2.Aufl. (1966) 159 ff.

42) Richards und Thompson, J.chem.Soc. (1947) 1248

43) D.Prevorŝek, Bull.Soc.chim.France (1958) 795

44) N.E.Alexandrou und G.S.Vasilikiotis, Spectrochim.Acta, Vol.23A (1967) 677-679

45) R.L.Hinman, J.org.Chem. 25 (1960) 1775

46) H.Fischer, Synthesis, Coll.Vol.3 (1960) 442-443

47) K.G.Paul, H.Theorell und Å.Åkeson, Acta.chem.scand. 7 (1953) 1284, ref. Methods in Enzymology II (1955) 752, Academ.Press Inc.Publishers, New York

48) H.S.Mason, Advances in Enzymol. 19 (1957) 117

49) H.S.Mason, I.Onopyrenko, D.K.Buhler, Biochem. et Biophysics Acta 24 (1957) 225

50) V.C.Barry und P.W.D.Mitchell, J.chem.Soc. (1953) 3723-3725

51) G.Schwenker, ref. 3.Nachtrag z.DAB.6., Wissenschaftl. Verlagsges. Stuttgart (1960) 249

52) H.Roth u.a., Analytik von funktionellen Atomgruppen und Verbindungsklassen, Methoden der org. Chemie, Analytik II, 4.Aufl. (1953) 529

53) H.Böhme und H.Wojahn, 3.Nachtrag z.DAB.6., Wissenschaftl. Verlagsges., Stuttgart, (1960) 248

54) E.Cingaloni und A.Gaudiano, Rend.Ist.sup.Sanita 17 (1954) 601, ref. Naturwissenschaften 42 (1955) 47

55) M.J.Dolin, Arch.Biochem.Biophysics 46 (1953) 483

56) S.W.Tanenbaum, Biochem.biophysic.Acta 21 (1956) 335

57) E.Krüger-Thiemer, persönliche Mitteilung

58) Th.Curtius, J.prakt.Chem. 50 (1894) 275; Ber.dtsch.chem. Ges. 26 (1893) 1263

59) E.Fahr und H.Lind, Angew.Chem. 78 (1966) 385

60) Th.Curtius und G.Struwe, J.prakt.Chem. 50 (1894) 300

61) Th.Curtius, Ber.dtsch.chem.Ges. 33 (1900) 2559

62) L.Kalb und O.Groß, Ber.dtsch.chem.Ges. 59 (1926) 727

63) C.A. 53 (1959) 22023g, Patentvorschrift, Ger. 1,001 987 Febr. 7. 1957

64) M.Rohrlich, Arch.Pharm. 284 (1951) 6-7

65) C.A. 50 (1956) P 7147 f. Patentvorschrift Brit. 729,348 May 4. 1955

66) K.Winterfeld, Praktikum der organ. präpar. Chemie, Verlag Theodor Steinkopf, Dresden und Leipzig, 6.Auflage (1965) 379

67) Organ. Syntheses Col.Vol.III, 438

68) F.Klages, Einführung in die organ. Chemie, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, (1961) 164

69) Küster-Thiel-Fischbeck, Logarithmische Rechentafeln, Walter de Gruyter u. Co, Berlin, 74.-83.Aufl. (1958) 146-148

70) Hager's Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Springer Verlag Berlin, Erg.-Band (1944) 35

71) Hager's Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, Erg.-Band II, (1958) 107

72) L.Gattermann und H.Wieland, Die Praxis des organ. Chemikers, Verlag Walter de Gruyter, 36.Aufl. (1954) 355

73) P.Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 6.Aufl. (1967) 82

74) H.U.Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim Bergstr. (1962) 5

75) H.U.Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim Bergstr. (1962) 134

Lebenslauf

Am 2. Juni 1938 wurde ich, Klaus-Dieter Hengstmann, als zweiter Sohn des Fabrikanten Dr. Ing. Walter Hengstmann und seiner Ehefrau Eleonore, geborene Schenck, in Berlin geboren.

Meine Schulzeit verbrachte ich in Berlin, wo ich 1958 an der Walther-Rathenau-Schule in Berlin-Grunewald meine Reifeprüfung ablegte.

Meine Praktikantenzeit leistete ich in der Alexandrinen-Apotheke in Berlin-Schmargendorf ab. Nach der pharmazeutischen Vorprüfung im Frühjahr 1960 nahm ich zum WS 60/61 mein Studium an der Technischen Universität Berlin auf, das ich im Frühjahr 1964 am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin mit der pharmazeutischen Prüfung abschloß.

Nach der Kandidatenzeit von 7 Monaten in der Emser-Apotheke in Berlin-Wilmersdorf erhielt ich im Januar 1965 von Herrn Prof. Dr. Helmut Loth das Thema der vorliegenden Dissertation. Zur gleichen Zeit wurde ich wissenschaftlicher Hilfsassistent am Pharmazeutischen Institut und bin ab April 1966 mit der Wahrnehmung der Geschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten beauftragt.

Im Juni 1965 erlangte ich die Bestallung als Apotheker.

Druck: Omnia - Organisation G. m. b. H.
Berlin 31 · Hohenzollerndamm 174
Telefon: 87 93 12